

PCT/JP2004/009785  
10/562776  
02.7.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

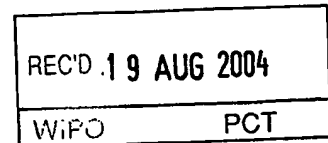
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   7 月   3 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 1 9 1 0 8 1  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [J P 2 0 0 3 - 1 9 1 0 8 1]

出 願 人      東 洋 紡 績 株 式 会 社  
Applicant(s):



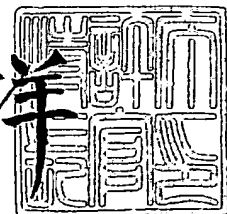
BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   8 月   5 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願

【整理番号】 3542003JP

【提出日】 平成15年 7月 3日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/531

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社内

    【氏名】 黒板 敏弘

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社内

    【氏名】 宝田 裕

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市上京区新町通り御霊前上ル下清蔵口 4 8 3  
                        西陣合同宿舍 1 2 4 号

    【氏名】 田中 直毅

【特許出願人】

    【識別番号】 000003160

    【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100065215

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 三枝 英二

    【電話番号】 06-6203-0941

【選任した代理人】

    【識別番号】 100076510

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 掛樋 悠路

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709328

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ブロッキング効率の向上したタンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質候補をスクリーニングする方法であって、以下の条件を満たすタンパク質もしくは部分配列タンパク質をスクリーニングする方法：

A. タンパク質のアミノ酸配列を 2 分し、それぞれの親水性アミノ酸 (D, E, K, H, R, Y) と疎水性アミノ酸 (G, A, V, L, I, M, F, W, P) の含有率から以下の式を用いて算出された 2 分された各部分での親水/疎水率の差の絶対値が 0.1 以上である；

$$\cdot (\text{親水/疎水率}) = (\text{親水性アミノ酸含有率}) / (\text{疎水性アミノ酸含有率})$$

B. 親水性部分の親水/疎水率 (親水/疎水率の高い方の値) が 0.5 以上；

C. 100 残基より多くのアミノ酸よりなる。

【請求項 2】 請求項 1 の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下 D の解析工程により得ることができる、以下の E の条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質：

D 1. ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項 1 の条件を満たす候補タンパク質 (0.5~1mg/ml: 20mM Tris-HCl (pH7.0) に希釈) および同様に調製したウシ血清アルブミン (Fraction V) を添加し、2℃~10℃で 4~5 時間ブロッキングし、液を廃棄する工程；

2. PBS(-) で 25~100 倍希釈した正常ヒト血清を添加し、37℃ にて 1 時間放置した後に、プレートを PBS (-) (0.05% Tween20) にて洗浄する工程；

3. 酵素標識した抗ヒト IgG 抗体を用いて非特異的にプレートに吸着した IgG 量を発色法を用いた比色法にて比較する工程；

E 候補タンパク質での発色がウシ血清アルブミンの発色の 2.5 倍以下である。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の条件 A, B, C を満たすタンパク質または部分配列タンパク質のアミノ酸配列の改変によりブロッキング効率を向上させた新規なタンパク質。

【請求項 4】 アミノ酸配列改変がアミノ酸置換、除去、挿入によるものであることを特徴とする請求項 3 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 5】 原核生物もしくは真核生物由来であることを特徴とする請求項 3 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 6】 「HSP70ファミリータンパク質」由来であることを特徴とするブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 7】 DnaKタンパク質由来であることを特徴とする請求項 6 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 8】 DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であることを特徴とする請求項 6 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 9】 DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、少なくともN末端から 387 番目まで、多くとも 472 番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする請求項 6 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 10】 DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、少なくともN末端から 387 番目まで、多くとも 418 番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする請求項 6 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 11】 DnaKタンパク質の 419～607 番目までのアミノ酸配列からなる請求項 6 に記載のタンパク質

【請求項 12】 ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換したことを特徴とする請求項 6 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 13】 ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、アミノ酸番号 479 と 481 のアスパラギン酸をバリンに置換した請求項 6 に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 14】 DnaKタンパク質の 384～607 番目のアミノ酸配列からなり、アミノ酸番号 479 と 481 のアスパラギン酸をバリンに置換した請求項 6 に記

載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

【請求項 15】 1 以上の親水性ドメインと 1 以上の疎水性ドメインを有するブロッキング用タンパク質であって、疎水性ドメインが器壁に吸着可能であり、親水性ドメインが器壁に吸着した疎水性ドメインを覆うことが可能であるブロッキング用タンパク質。

【請求項 16】 ブロッキング速度が BSA よりも向上していることを特徴とする改変されたタンパク質。

【請求項 17】 3 時間のブロッキングにおいて BSA と同等のブロッキング効率を示すようにタンパク質量を揃えた条件において、10 分未満のブロッキング能が BSA よりも優れることを特徴とする請求項 16 に記載の改変されたタンパク質。

【請求項 18】 タグ配列を有することを特徴とする請求項 2 ～ 17 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 19】 タグ配列がヒスチジンタグ、マルトースバインディングプロテイン (MBP) タグ、グルタチオン S 転移フェラーゼ (GST) タグ、Flag タグ、Myc タグ、タンデムアフィニティーピュリフィケーションタグから選択されることを特徴とする請求項 18 に記載のタンパク質。

【請求項 20】 原核生物を用いて請求項 2 ～ 19 のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法。

【請求項 21】 大腸菌を用いて請求項 2 ～ 19 のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法。

【請求項 22】 無細胞タンパク質合成法を用いて請求項 2 ～ 19 のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法。

【請求項 23】 加熱工程を経ることを特徴とする請求項 2 ～ 19 のいずれかに記載のタンパク質の精製方法。

【請求項 24】 請求項 2 ～ 19 のいずれかに記載のタンパク質をブロッキング、安定化、賦形、フォールディング補助、リフォールディング補助、コーティング、医療用に使用する方法。

【請求項 25】 請求項 2 ～ 19 のいずれかに記載のタンパク質を含有するブロッキング試薬、安定化剤、賦形剤、フォールディング補助剤、リフォールディング

補助剤、コーティング剤または医療用コーティング剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質候補をスクリーニングする方法に関し、更には、本発明はタンパク質のアミノ酸配列を改変することにより、ブロッキング効率の向上したタンパク質に関する。更には、該タンパク質を含有する、ブロッキング試薬、安定化剤、賦形剤、フォールディング補助剤、リフォールディング補助剤、医療用コーティング剤にも関する。本発明は、大腸菌での高発現可能なタンパク質のブロッキング効率を向上させることができ、ブロッキング効率に優れたタンパク質を組換えで大量に生産する場合有用である。

【0002】

【従来技術】

従来、免疫測定などで用いられるブロッキング剤としては生体成分から直接抽出したタンパク質が多く使用されてきた。特にウシ由来のアルブミンやカゼインなどが広く使用されてきた歴史がある。しかし近年、狂牛病などの問題から、様々な制限が加えられている現状である。一方、組換え体を用いてそれらを製造する方法は、病原体（物質）を排除できる利点はあるが、生産性などの問題点から実用に至っているものは少ない。

【0003】

よって、大腸菌などに由来するタンパク質を、代替タンパク質として使用するという試みが、生産性という立場からは好ましいと言える。しかし、大量発現できるタンパク質が必ずしもブロッキング効率が良いわけではなく、組換え体で生産できるブロッキング効率に優れたタンパク質を見出さなければならないという問題点があった。

【0004】

近年、様々な生物の遺伝子配列が明らかとなったが、予想されるアミノ酸配列よりブロッキング効率に優れたタンパク質を見出す法則は未だ知られておらず、

そのようなタンパク質を探すには非常な手間が掛かる作業であると思われていた。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

このような理由から、組換え体で大量生産できるブロッキング効率に優れた代替タンパク質が求められていた。

すなわち本発明の目的は、アミノ酸配列からブロッキング能を有するタンパク質を簡便に見出す方法を提供するとともに、大腸菌等で大量発現可能、かつアミノ酸配列改変によりブロッキング効率を向上させたタンパク質を提供することである。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

上のような背景を踏まえ、鋭意検討した結果、ブロッキング能を有するタンパク質に特徴的なアミノ酸配列に関する性質を見出すと共に、そのようにして見出されたタンパク質のアミノ酸配列を改変することによりブロッキング効率を飛躍的に高めることが出来ることを見出し、本発明に至った。

#### 【0007】

すなわち本発明は、以下の構成からなる。

(1) アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質候補をスクリーニングする方法であって、以下の条件を満たすタンパク質もしくは部分配列タンパク質をスクリーニングする方法

A. タンパク質のアミノ酸配列を2分し、それぞれの親水性アミノ酸(D, E, K, H, R, Y)と疎水性アミノ酸(G, A, V, L, I, M, F, W, P)の含有率から以下の式を用いて算出された2分された各部分での親水/疎水率の差の絶対値が0.1以上である

$$\cdot (\text{親水/疎水率}) = (\text{親水性アミノ酸含有率}) / (\text{疎水性アミノ酸含有率})$$

B. 親水性部分(親水/疎水率の高い方の値)が0.5以上

C. 100残基より多くのアミノ酸よりなる

(2) (1)の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規



なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下Dの解析工程により得ることができる、以下のEの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質

D 1. ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項1の条件を満たす候補タンパク質 (0.5~1mg/ml: 20mM Tris-HCl (pH7.0)に希釈) および同様に調製したウシ血清アルブミン (Fraction V) を添加し、2℃~10℃で4~5時間ブロッキングし、液を廃棄する工程;

2. PBS(-)で25~100倍希釈した正常ヒト血清を添加し、37℃にて1時間放置した後に、プレートをPBS (-) (0.05%Tween20) にて洗浄する工程;

3. 酵素標識した抗ヒトIgG抗体を用いて非特異的にプレートの吸着したIgG量を発色法を用いた比色法にて比較する工程;

E 候補タンパク質での発色がウシ血清アルブミンの発色の2.5倍以下である。

(3) (1) に記載の条件A, B, Cを満たすタンパク質または部分配列タンパク質のアミノ酸配列の改変によりブロッキング効率を向上させた新規なタンパク質  
(4) アミノ酸配列改変がアミノ酸置換、除去、挿入によるものであることを特徴とする(3)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(5) 原核生物もしくは真核生物由来であることを特徴とする(3)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(6) 「HSP70ファミリータンパク質」由来であることを特徴とするブロッキング効率の向上したタンパク質。

(7) DnaKタンパク質由来であることを特徴とする(6)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(8) DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であることを特徴とする(6)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(9) DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、少なくともN末端から387番目まで、多くとも472番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする(6)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(10) DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、

少なくともN末端から387番目まで、多くとも418番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする(6)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(11) DnaKタンパク質の419～607番目までのアミノ酸配列からなる(6)に記載のタンパク質

(12) ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換したことを特徴とする(6)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(13) ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換した(6)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(14) DnaKタンパク質の384～607番目のアミノ酸配列からなり、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換した(6)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(15) 1以上の親水性ドメインと1以上の疎水性ドメインを有するブロッキング用タンパク質であって、疎水性ドメインが器壁に吸着可能であり、親水性ドメインが器壁に吸着した疎水性ドメインを覆うことが可能であるブロッキング用タンパク質。

(16) ブロッキング速度がBSAよりも向上していることを特徴とする改変されたタンパク質。

(17) 3時間のブロッキングにおいてBSAと同等のブロッキング効率を示すようにタンパク質量を揃えた条件において、10分未満のブロッキング能がBSAよりも優れることを特徴とする(16)に記載の改変されたタンパク質。

(18) タグ配列を有することを特徴とする(2)～(17)のいずれかに記載のタンパク質

(19) タグ配列がヒスチジンタグ、マルトースバインディングプロテイン(MBP)タグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タグ、Flagタグ、Mycタグ、タンデムアフィニティーピュリフィケーションタグから選択されることを特徴

とする(18)に記載のタンパク質

(20) 原核生物を用いて(2)～(19)のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法

(21) 大腸菌を用いて(2)～(19)のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法

(22) 無細胞タンパク質合成法を用いて(2)～(19)のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法

(23) 加熱工程を経ることを特徴とする(2)～(19)のいずれかに記載のタンパク質の精製方法

(24) (2)～(19)のいずれかに記載のタンパク質をブロッキング、安定化、賦形、フォールディング補助、リフォールディング補助、コーティング、医療用に使用する方法

(25) (2)～(19)のいずれかに記載のタンパク質を含有するブロッキング試薬、安定化剤、賦形剤、フォールディング補助剤、リフォールディング補助剤、コーティング剤または医療用コーティング剤。

#### 【0008】

ここでいうブロッキングとは、容器や担体などへの成分の非特異的吸着を妨げることを言い、特にプラスチックなどの樹脂へのタンパク質の非特異的吸着を妨げることをいう。様々な測定において、測定対照の成分が非特異的に器壁に吸着することにより、バックグラウンドとして測定を妨げることが問題となる。特に免疫学的測定において、抗体のポリスチレンプレートへの吸着は顕著であり、通常、あらかじめ樹脂等に吸着しやすいタンパク質を添加して、抗体の非特異的吸着を妨げる操作、すなわちブロッキングを行うことが広く行われている。免疫的測定には、タンパク質を器壁に物理的に吸着させることが必須であることから、ポリスチレン等の樹脂で出来たタンパク質の吸着しやすいプレートが広く使われるが、余分な成分の吸着も顕著であるため、より良いブロッキング剤が常に求められているのが現状である。また、臨床用診断薬においても、診断薬用酵素の自動分析機のセルへの非特異吸着が問題となっているものも多い。

#### 【0009】

本発明では主に、免疫学的測定を念頭に置き、最も非特異吸着が顕著である例として知られているヒト血清中のIgGのポリスチレンプレートへの非特異吸着を測定することで、ブロッキング効果を測定した。すなわち、測定は以下の工程よりなる。

(1) ポリスチレン製96穴プレートにブロッキング能を調べたいタンパク質溶液を加え、一定時間静置し、プレートをブロッキングする。

(2) (1)の液を除去し、希釈したヒト血清を添加し、インキュベートする。

(3) プレートを洗浄した後、標識抗ヒトIgG抗体を添加し、インキュベートする。

(4) プレートを洗浄した後、比色法により非特異的に結合したIgG量を比較する。

詳細な方法については以下で述べるが、この方法は本発明を遂行するにあたり非常に有効であった。本方法の概略を図1に示す。

#### 【0010】

ブロッキング試薬としては、従来ウシ血清アルブミン (BSA) やウシ乳中のカゼインなどが広く使われて来た。しかし、それらの高いブロッキング能がタンパク質のどの性質から来るのか、理論立てた説明は未だなされておらず、一般にはその疎水性に起因していることが通説のようにになっている。

#### 【0011】

そこで、まず疎水性の高いタンパク質にブロッキング能が備わっているのかを調べる目的で疎水性アミノ酸の含量が高いことが知られている *Pseudomonas aeruginosa* 由来のリパーゼをブロック剤として使用し、そのブロック能を調べた。リパーゼは臨床検査用途などにも使われているが、測定時のセル吸着などが問題となることあるほどプラスチック表面への吸着能が高いことが知られている。しかし、実験の結果、ブロッキングの効果はほとんど見られないことが明らかとなった。それぞれのタンパク質中の親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の比率等を表1に示したが、比較してみるとBSAやカゼインの疎水性はリパーゼの疎水性に較べ低いことが分かる。このことから考察される事項としては、タンパク質がその疎水性で吸着する現象と、ブロッキング能とは関連はあるが、すべてではないと

いうことである。リパーゼのブロッキング能が発揮されなかった理由としては、器壁に吸着したリパーゼにタンパク質が非特異的に吸着したことに起因していると推察される。

【表 1】

ブロッキングに頻繁に使用されるタンパク質と疎水性の高いタンパク質の親水性、疎水性アミノ酸の含有率を示す。

	BSA	$\alpha$ カゼイン	リパーゼ
親水性アミノ酸含有率	0.37	0.34	0.21
疎水性アミノ酸含有率	0.41	0.45	0.51
親水/疎水率	0.90	0.76	0.41
ブロッキング能	○	○	×

【0012】

ここでいう親水性アミノ酸、疎水性アミノ酸は教科書等によっては、様々な定義があるが、本発明においては、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンとした。また、疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンと定義した。

【0013】

本発明では、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンと定義した。また、疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンと定義したが、親水性アミノ酸で His, Tyr、特に Tyr は親水性が低く、疎水性アミノ酸で Gly、Ala、特に Gly は疎水性が低いと考えられ、更に厳密に厳密性を持たせて予測するためには、Tyr と Gly を除外して計算し、更に好ましくは、His、Tyr、Gly、Ala を除外して計算すると良い結果が得られることもある。また、後に示すブロッキング能の改変においても、親水性、疎水性の強弱を念頭において改変を行うことが好ましい。

【0014】

そこで次に、様々な切り口からそれぞれのアミノ酸の含有率を計算したところ、ブロッキング能を示す BSA（シグナルペプチドなし）とウシ由来  $\alpha$  カゼイン（

シグナルペプチドなし)のアミノ酸配列の2分された各部分、例えばN末端側とC末端側で、親水性アミノ酸含有率と疎水性アミノ酸含有率の傾向が異なることが明らかとなった(表2)。本発明において、親水性アミノ酸含有率を疎水性アミノ酸含有率で割った値を便宜上「親水/疎水率」と定義するが、BSAのN末端側の親水/疎水率は1.00であるのに対し、C末端側は0.83であり、0.17の差があることがわかる。 $\alpha$ カゼインでは、N末端側0.88、C末端側0.64となりその差は0.24であった。一方、ブロッキング能を示さないPseudomonas由来のリパーゼにおいては、N末端側0.39、C末端側が0.44とその差が0.05であり0.1にも満たないことが分かった。このことから、ブロッキング能を示すには、タンパク質分子の中の比較的疎水的な領域に加え、親水的な領域が必要であるということが条件になっていることが推察された。

本発明のタンパク質において、親水性部分、疎水性部分及び全長の親水/疎水率は、以下の範囲が好ましい。

親水性部分の親水/疎水率は0.5~2.0、より好ましくは0.7~1.7、さらに好ましくは0.8~1.5である。

疎水性部分の親水/疎水率は0.2~1.1、より好ましくは0.3~1.0、さらに好ましくは0.4~0.9である。

タンパク質全体の親水/疎水率は0.4~2.0、より好ましくは0.5~1.5、さらに好ましくは0.6~1.0である。

親水性部分と疎水性部分の親水/疎水率の差(絶対値)は好ましくは0.1~0.6、より好ましくは0.15~0.5、さらに好ましくは0.15~0.4である。

【表 2】

BSA、 $\alpha$ カゼイン、リパーゼ、DnaK384-607 の N 末端側と C 末端側の含有アミノ酸の特徴を示す

	BSA			$\alpha$ カゼイン			リパーゼ			DnaK 384-607		
	N 末端側	C 末端側	全長	N 末端側	C 末端側	全長	N 末端側	C 末端側	全長	N 末端側	C 末端側	全長
親水性アミノ酸含有率	0.40	0.35	0.37	0.37	0.30	0.34	0.22	0.20	0.21	0.25	0.37	0.29
疎水性アミノ酸含有率	0.40	0.42	0.41	0.42	0.47	0.45	0.57	0.45	0.51	0.50	0.41	0.45
親水/疎水率	1.00	0.83	0.90	0.88	0.64	0.76	0.39	0.44	0.41	0.50	0.90	0.64
$\Delta$	0.17			0.24			0.05			0.40		

| $\Delta$ | は N 末端側と C 末端側の親水疎水率の差の絶対値を示す。

## 【0015】

親水性部分と疎水性部分は、いずれが 2 分された各部分、例えば C 末端側（或いは N 末端側）であってもよい。

## 【0016】

また、本発明は、親水性部分と疎水性部分が 2 分された各部分、例えば C 末端側或いは N 末端側に存在すると仮定しているが、N 末端側又は C 末端側に親水性でも疎水性でもない配列を追加したものも、親水性部分と疎水性部分が存在する限り、本発明に含まれる。

## 【0017】

さらに本発明は、図 2 に示すように親水性部分－疎水性部分－親水性部分や、疎水性部分－親水性部分－疎水性部分、さらには親水性部分－疎水性部分－親水性部分－疎水性部分のような順序で各部分を有するものも本発明に含まれる。

## 【0018】

上のことを踏まえると、疎水部分（疎水ドメイン）が器壁に吸着し、親水部分（親水ドメイン）がその上にかぶさるような形態をとり、全体でみると親水部分で器壁を覆うようにして、プロッキングしていることが推察される。そのモデルを図 3 に示す。リパーゼがプロッキング能を示さなかったのは、吸着されるが、

吸着されたタンパク質が疎水的でありすぎたため、そのタンパク質への更なる非特異的吸着が起きたことが予想される。

#### 【0019】

器壁に吸着する疎水性部分と、疎水性部分を覆う親水性部分の比率は、疎水性部分1に対し親水性部分0.3～10、好ましくは0.5～5、さらに好ましくは0.7～2である。疎水性部分が大きすぎると親水性部分により覆うことができなくなり、器壁に吸着された疎水性部分に、さらに他のタンパク質が吸着することになる。また、親水性部分が大きすぎると、疎水性部分が器壁に吸着する面積が小さくなりすぎ、十分強固に吸着できなくなったり、ブロッキングの効率が低下したりする。

なお、本発明において、「2分する」とは、全配列を約50%ずつ分けることを意味するのではなく、疎水性部分と親水性部分の2つに分けるというだけの意味である。親水性部分と疎水性部分の一方又は両方が複数存在する場合、複数存在する親水性部分／疎水性部分の親水／疎水率は、平均値として計算される。また、親水性部分、疎水性部分は、各々ひとかたまりの部分、好ましくはドメイン構造を有するものであり、各部分は、全体配列の20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上である。ただ、タンパク質の構造が分かっていたり、予測困難な場合には、アミノ酸配列をN末端側とC末端側に大きく2分して解析するが好ましく、効果的である。

#### 【0020】

表2を見る限りでは、親水／疎水率の親水ドメインと疎水ドメイン間の差はタンパク質間では若干ばらつきがあり、その値の大きさのみがブロッキング能力を詳細まで反映していない可能性もあると思われる。そのファクターの一つは分子量であると思われる。本発明において、「100残基より多くのアミノ酸よりなる」とは、アミノ酸配列全体のアミノ酸合計数が100残基以上であることを意味し、好ましくは150残基より多くのアミノ酸よりなり、より好ましくは200残基より多くのアミノ酸よりなる。また、上限は2000アミノ酸残基であることが好ましく、より好ましい上限は1500アミノ酸残基、さらに好ましい上限は1000アミノ酸残基である。



親水性の部分またはドメインのアミノ酸数は、好ましくは30アミノ酸残基以上、より好ましくは50アミノ酸残基以上、さらに好ましくは60アミノ酸残基以上、特に好ましくは80アミノ酸残基以上であり、また、好ましくは1000アミノ酸残基以下、より好ましくは500アミノ酸残基以下である。

疎水性の部分またはドメインのアミノ酸数は、好ましくは30アミノ酸残基以上、より好ましくは50アミノ酸残基以上、さらに好ましくは60アミノ酸残基以上、特に好ましくは80アミノ酸残基以上であり、また、好ましくは1000アミノ酸残基以下、より好ましくは500アミノ酸残基以下である。

#### 【0021】

ここでいうドメインとは、分子の構造上あるいは機能上一つのまとまりをもつ領域のことをいうわけであるが、本発明においては主に、構造上のまとまりのある単位のことをいう。

#### 【0022】

次に我々は、この仮定が正しいか否か、単純なタンパク質を用いて証明することとした。この実験には、大腸菌のヒートショックタンパク質の一種であるHSP70 (DnaK) の基質結合ドメインを用いた。このタンパク質(DnaK 384-607)は、既にNMR解析で構造が明らかとなっており(図4)、2つの構造的な領域(ドメイン)、すなわちN末端側の $\beta$ シート領域(ドメイン)とC末端側の $\alpha$ ヘリックス領域(ドメイン)からなっていることが分かっている。また、配列のN末端側の親水/疎水率が0.5であり、C末端側では0.89で、その差は0.39と高い値を示すことが計算によって明らかにされた。

#### 【0023】

そこでまず、このタンパク質(DnaK 384-607)がブロッキング能を示すかを確認したところ、BSA程ではないがブロッキング能があることが確認され(図5)、本発明の方法の有効性が示された。

#### 【0024】

そこで次に、DnaK 384-607の種々のデリーションミュータントを作製し、DnaKのどの構造がブロッキングに対して重要な役割を果たしているかを調べた。今回検討した変異体を図6に示した。検討したタンパク質は、DnaK 384-638、

DnaK 384-607、DnaK 384-578、DnaK 384-561、DnaK 508-607、DnaK 525-607の5種類である。これらのタンパク質は大腸菌を宿主として大量発現が可能であり、それぞれのタンパク質のN末端側にヒスチジンタグを付加して発現させ、ニッケルキレートカラムを用いて簡便に精製し、実験に用いることができる。今回の実験はヒスチジンタグを付加したタンパク質を用いて検討を行っているが、タグが小さいためその影響は無視した。当然、タグ配列がない場合にも同等の効果が得られることは確認してある。

#### 【0025】

実験の結果、 $\alpha$ ヘリックス構造の一部を削ったDnaK 384-578、DnaK 384-561と $\beta$ シート部分を除去し $\alpha$ ヘリックス構造のみからなると思われるDnaK 508-607、DnaK 525-607のブロッキング効率は有意に低下することが分かった(図5)。DnaK 384-561に関しては、既にそれに近いDnaK381-553のNMRによる立体構造が明らかとなっており(図7)、それから類推すると、 $\alpha$ ヘリックス構造が壊れていることが予想される。これらのことから以下のことが示唆される。すなわち、(1)ブロッキング能を有するタンパク質の親水性部分の縮小や構造破壊によってブロッキング能は損なわれる。(2)親水性部分だけではブロッキング能を示さない。これは、ブロッキング能を発揮するには、疎水性部分に加えて親水性部分が重要であり、ブロッキング能を示すタンパク質は図3に示すように疎水部分でプレートに吸着し、親水性部分でプレート表面を覆う結果ブロッキング効果を発揮していると考えられるからであると思われる。DnaKにおいては正に図3の左図のようになっているものと予想される。

#### 【0026】

一般的に、変性やミューテーションなどにより2次構造が崩壊することで、タンパク質の親水性が失われることが知られており、上のDnaKの例からも親水ドメインを破壊するようにして、部分配列タンパク質を調製することは適切でないことが予想される。それとは逆に図8のように疎水ドメインを破壊することにより、疎水性を向上させることは可能であると思われる。

#### 【0027】

また、本発明において、ドメインが重要であり、少なくとも1つより多くのド

メイン構造が必要であると思われる。そこで、一つの構造ドメインを構成するのに必要とされる100アミノ酸が目安となる。よって、本発明は少なくとも100残基より多くのアミノ酸からなる、すなわち一つより多くのドメイン構造を有することが望ましいといえる。

#### 【0028】

そのような事実を踏まえ、本発明は、アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規ブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質をスクリーニングする方法を提供する。詳しくは、以下に示す条件を満たすタンパク質もしくは部分配列タンパク質をスクリーニングする方法である。

A. タンパク質のアミノ酸配列を2分し、それぞれの親水性アミノ酸 (D, E, K, H, R, Y) と疎水性アミノ酸 (G, A, V, L, I, M, F, W, P) の含有率から以下の式を用いて算出された2分された各部分での親水/疎水率の差の絶対値が0.1以上である

$$\cdot (\text{親水/疎水率}) = (\text{親水性アミノ酸含有率}) / (\text{疎水性アミノ酸含有率})$$

B. 親水性部分 (親水/疎水率の高い方の値) が0.5以上

C. 100残基より多くのアミノ酸よりなる

#### 【0029】

上記条件中、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Kはリジン、Hはヒスチジン、Rはアルギニン、Yはチロシン、Gはグリシン、Aはアラニン、Vはバリン、Lはロイシン、Iはイソロイシン、Mはメチオニン、Fはフェニルアラニン、Wはトリプトファン、Pはプロリンを示す。教科書等によっては、親水性アミノ酸、疎水性アミノ酸には様々な定義があるが、本発明においては、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンとした。また、疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンとした。

#### 【0030】

本発明でいう部分配列タンパク質とは、野生型タンパク質の一部分のアミノ酸配列からなるタンパク質を示し、好ましくは一つより多くのドメイン構造を有す

るタンパク質である。

#### 【0031】

アミノ酸配列を例えばN末端側とC末端側に2分する場合、必ずしも正確に2分する必要はないがなるべく双方のアミノ酸の数がほぼ均等になるように分割する方が好ましい。また、アミノ酸配列からシグナルペプチドが予想される場合は、その部分は除いて計算すると良い。実際、本発明においても、BSA、 $\alpha$ カゼイン、リパーゼともにシグナルペプチドを除去した成熟型のアミノ酸配列を用いて計算を行った。

#### 【0032】

また、図2に示したようなN末端側、C末端側へ二分する以外の分割方法も好ましく用いられる。このような場合、立体構造が明らかになっているタンパク質や立体構造が予測されるタンパク質の方が好ましく応用されうる。

#### 【0033】

アミノ酸一次配列から、各種アミノ酸含量を算出するには遺伝子・アミノ酸配列解析ソフトを用いることが効果的である。解析ソフトとしては特に限定されないが、本発明においては、GENETYX（ソフトウェア開発株式会社）を用いて行った。

#### 【0034】

また、ソフトウェアの疎水性計算機能を用いてタンパク質の疎水性、親水性をグラフ化することも、スクリーニング作業を効率的に進めるためには効果的である。好ましくは、hopp&woodsの計算式が用いられる。

#### 【0035】

また本発明は、上記方法によりアミノ酸配列からスクリーニングされたブロッキング能を有するタンパク質または部分配列タンパク質であって、以下のDの解析工程により、Eの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質である。

D 1. ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項1の条件を満たす候補タンパク質（50～100mg/ml：20mM Tris-HCl（pH7.0）に希釈）および同様に調製したウシ血清アルブミン（Fraction V）を添加し、2℃～10℃で4～5時間ブロッキングし、液を廃棄する工程

2. PBS(-)で25~50倍希釈した正常ヒト血清を添加し、37℃にて1時間放置した後、プレートを0.05%Tween20/ PBS (-) にて洗浄する工程

3. 酵素標識した抗ヒトIgG抗体を用いて非特異的にプレートに吸着したIgG量を発色法を用いた比色法にて比較する工程

E. 候補タンパク質での発色がウシ血清アルブミンの発色の2.5倍以下、好ましくは2倍以下、より好ましくは1.5倍以下、さらに好ましくは1.2倍以下、特に1倍以下である。

#### 【0036】

ここでは、プラスチックプレートへの非特異吸着が顕著であることが知られている、ヒト血清中のIgGの非特異的吸着を目安として、ブロッキング能を測定する。ここでいうポリスチレンイムノタイタープレート（96ウェルタイプ）とは一般的に免疫測定で使用されるポリスチレン製の96ウェルタイプのイムノタイタープレートを使用する。候補タンパク質は適切な方法で精製したものをを用い、最終的に20mMTris-HCl(pH7.0)で50~100mg/mlとなるように希釈しておく。同時にウシ血清アルブミン（BSA）も同様に調製しておく。BSAはSIGMA社等から市販されているFractionVを用いることができる。また同じ性能であるのであれば、特にFraction Vでなくても良い。ブロッキングは2~8℃で4~5時間行った後、液を完全に除去し、洗浄なしで次のステップへ進む。

#### 【0037】

ここで使用されるヒト血清は正常成人から分離した血清であれば特に限定されず、原液は高濃度であるのでPBS(-)で25~50倍に希釈して使用するのが良い。血清中のIgGの量は個体差があるので、希釈率を多少変更してもかまわない。プレートへの非特異吸着は37℃、30分間行う。また、この時添加する血清の量は正確に測定するために、最初にブロッキングした液量よりも少ない量にすることが好ましい。例えば、ブロッキングを100 $\mu$ lで行った場合は、50 $\mu$ lの希釈血清溶液を添加する。最後に、正確に1時間反応を行った後、液を除き、十分量の0.05%Tween20/ PBS (-) にて洗浄を行う。洗浄は、3回以上が好ましく、更に好ましくは4回行う。洗浄は、専用のプレート洗浄機を用いても良い。

#### 【0038】

次に、酵素標識した抗ヒトIgG抗体を適切な溶液で適切な濃度にまで希釈し、上記ウェルに添加する。反応時間は37℃、1時間が適切である。抗体の希釈は、通常免疫学的検出に用いる程度が好ましく、また、抗体の希釈には適切なブロッキング剤（BSAやカゼイン）が含有されていた方がばらつきが無く良く、更に好ましくは、0.01M リン酸バッファー（pH7.4）、0.15M NaCl、0.5% カゼインを用いると良い。標識に用いる酵素としては、ペルオキシダーゼとアルカリホスファターゼが好ましく用いられ、特にペルオキシダーゼが好ましく用いられる。ペルオキシダーゼ用の発色試薬としては、テトラメチルベンジジン（TMBZ: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine）が好ましく用いられる。また、アルカリホスファターゼの発色基質としては、WT-1を用いることが出来る。発色時間は、目的となるウェルの吸光度が定量性を失わない程度（0.5～1.5）に来るようにするのが望ましい。定量域を越えた場合は、正しい値は得られないので、注意する。また、全操作を通じてなるべくプレートを乾燥させないようにしなければ正確な値は得られない。

#### 【0039】

このようにして得られた値は、低いほどブロッキング効率が低いことを示しており、本発明においては、BSAの値の2.5倍以下の値を示した場合、ブロッキング能を有したと判定した。よって、本発明のブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質は請求項1に示した条件を満たし、かつ、本アッセイでBSAの値の2.5倍以下の値を示す、すなわちブロッキング能を有するタンパク質である。

#### 【0040】

このことから、本発明は一つより多くのドメイン構造を有することが好ましいといえるが、この例のように特に疎水側ドメインについては二つのドメインのうち一つのドメイン構造の一部を欠いても良い。本発明のタンパク質又は部分配列タンパク質のアミノ酸の数としては100以上、好ましくは150以上、さらに好ましくは、180以上が好ましい。

#### 【0041】

さらに、本発明は、上記請求項1の条件に合うタンパク質のアミノ酸配列を改

変することにより、タンパク質もしくはその部分配列タンパク質のブロッキング効率を更に向上させた新規なタンパク質である。ここでいう新規とは、アミノ酸改変のレベルで新規ということであり、既に知られているタンパク質であっても良い。また、部分配列の場合、今まで知られていない部分配列を有するものも新規とみなされる。

#### 【0042】

本発明において、アミノ酸配列の改変は、アミノ酸置換、除去（デリーション）、挿入（インサージョン）のいずれか、もしくは、重複して行っても良い。変異の方向性としては、疎水領域の疎水性をさらに向上させるような変異や親水性領域の親水性をさらに向上させるような変異が効果的であり、好適に使用される。また、タンパク質の立体構造を変化させるために、アミノ酸配列の除去や挿入なども効果的であり、親水的な領域に埋もれた疎水領域をタンパク質表面に露出されることなどの方法が考えられる。一方、上記の例で示したように、親水ドメインの構造を壊す方のアミノ酸改変は好ましくないとと言える。

#### 【0043】

改変されるタンパク質は原核生物もしくは真核生物由来のものでも良く、大腸菌などを用いて大量調製することを考えると、原核生物由来のタンパク質が好ましく用いられる。更に好ましくは、大腸菌由来のタンパク質が用いられる。用いられるタンパク質はドメインなどの一部分の構造体でも良く、むしろ好適に使用される。

#### 【0044】

特に、ブロッキング剤は時に酵素等と混合して安定化剤や賦形剤として用いられることが多く、酵素活性の特別な機能を有さないタンパク質が本発明には適しているといえる。また、酵素活性を有するドメインを除去したタンパク質なども好ましく用いられる。

#### 【0045】

本発明では、HSP70ファミリータンパク質由来のタンパク質が好ましく用いられ、更に好ましくは大腸菌のDnaKタンパク質由来のタンパク質が用いられる。また、好ましくは、ATPaseドメインを除去したHSP70ファミリータンパク質の基質結

合ドメインが好ましく用いられ、更に好ましくは大腸菌のATPaseドメインを除去したDnaKタンパク質の基質結合ドメインが用いられる。DnaKタンパク質の基質結合ドメインに関しては、既に実施例として上で紹介したものである。

#### 【0046】

本発明に用いるHSP70ファミリーに属するタンパク質としては、特に指定はないが、大腸菌のDnaK、酵母細胞質に存在する Ssalp、酵母ミトコンドリアに存在する Ssc1p、酵母小胞体に存在するKar2p、哺乳類細胞質に存在するHSP70、哺乳類小胞体に存在する Bip、哺乳類ミトコンドリアに存在する mHsp70 および熱ショックの有無に関わらず恒常的に発現しているHSP70のホモログであるHSC70などから選択される。HSP70ファミリーには数多くのホモログが知られており、上に挙げたものはそのうちの一部である。当然、上に列挙した以外のホモログにも同様の効果が期待できることは容易に予想可能である。

#### 【0047】

特に、大腸菌のDnaKは良く研究が進んでいることから、アミノ酸改変などの効果予測が比較的容易であるといえる。このタンパク質は638アミノ酸から構成され、1～385番目のアミノ酸より構成される「ATPase(ATP結合)ドメイン」と386～638番目のアミノ酸より構成される「基質結合ドメイン」からなっている(図6)。配列番号1にDnaKのタンパク質の配列を、また配列番号2に遺伝子配列を示す。HSP70は新生ポリペプチドや部分的にフォールドしたタンパク質に結合し、自発的にフォールディング出来ないタンパク質のリフォールディングを助けることが知られており、また、タンパク質合成の比較的初期に働くためより豊富な基質を認識することが知られている。

#### 【0048】

また、DnaKの基質結合ドメイン自体に、変性したタンパク質のリフォールディングを促す作用があることも知られており(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2002) 99, 15398-15403)、この分子を用いることにより、様々な用途展開が可能になると考えられる。

#### 【0049】

今回の本発明を達成するにあたり、我々はこのDnaKの基質結合ドメインに着目し



、様々な検討によって、ブロッキング作用発現のメカニズムに関する様々な知見を得ることが出来、本発明に至ることが出来た。

#### 【0050】

まず我々は、 $\beta$ シート構造部分に変異を加えることで $\beta$ シート部分の疎水性を向上させ、ブロッキング効率に優れたタンパク質を作り出す試みを行った。その試みは(1)  $\beta$ シートのN末端の一部を除去することで、 $\beta$ シートのより疎水的な部分を露出させる( $\beta$ シート構造を破壊して疎水性を向上させる)、(2)  $\beta$ シート上の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換する、というものである。その結果、 $\beta$ シート構造のN末端部分を除去したDnaK 419-607と、 $\beta$ シート上の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換したDnaK384-607 (D479V, D481V) にブロッキング効率の顕著な向上を認めることができた(図9)。今回特に、DnaK 419-607に顕著なブロッキング効率の向上を認めることが出来た。このタンパク質は、図8で示したような形でブロッキングを示していると思われる。すなわち、疎水性ドメインの構造が変化したことで、疎水性ドメインの構造が変化し、疎水性ドメインの疎水性が向上したことが、ブロッキング能の向上につながったと考えられる。

#### 【0051】

本発明でいう、ブロッキング能の向上とは、候補タンパク質にアミノ酸置換、デリーション、挿入などを行い、もととなったタンパク質またはタンパク質部分配列よりもブロッキング能が向上したことを示す。

#### 【0052】

このブロッキング能の向上は、好ましくは請求項2に示した方法で測定されるのが好ましい。また、ブロッキング能の向上には、長時間のブロッキング能と短時間でのブロッキング能があるが、どちらかもしくは両方においてブロッキング能が向上していれば良い。

#### 【0053】

DnaK 419-607での効果が顕著であった理由を更に詳しく考察すると、DnaK基質結合ドメインのコの字型の構造のヒンジ部分に隣接する $\beta$ シート部分を除去したことによりシャペロンの基質としてのペプチドをトラップするための疎水性に富

んだコ字構造の内側の一部分が外側へ露出したことに起因していることが推察される。

#### 【0054】

すなわち、本発明は少なくともN末端から387番目まで、多くとも472番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とするブロッキング効率の向上したDnaKタンパク質である。また、本発明は少なくともN末端から387番目まで、多くとも418番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とするブロッキング効率の向上したDnaKタンパク質である。さらに好ましくは、DnaKタンパク質の419～607番目までのアミノ酸配列からなるタンパク質である。

#### 【0055】

また、本発明は、ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換したことを特徴とするブロッキング効率の向上したタンパク質である。更に詳しくは、ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換したブロッキング効率の向上したタンパク質である。また更に好ましくは、DnaKタンパク質の384～607番目のアミノ酸配列からなり、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換したタンパク質が使用される。

#### 【0056】

本発明でいう改変されたとは、候補タンパク質のアミノ酸置換、デリーション、挿入などにより、アミノ酸配列が改変されたことを指す。この改変は、候補タンパク質もしくはタンパク質の部分配列を選び出した後、上に示したような考察により、(1) 親水ドメインを破壊しないようにする、(2) 疎水ドメインを更に疎水性にする、などを意図してアミノ酸を改変することが好ましい。また、本発明では示さなかったが、親水性ドメインを更に親水性にするような方策を当然考えるべきである。

#### 【0057】

また、本発明においてはブロッキングの速度に関する検討も実施し、本発明の有用性を示した。すなわち、5分、10分、30分、3時間ブロッキングした時の、ブ

ロッキング効率を測定した。その結果、今回効果が最も顕著であったDnaK419-607は、約5分間のブロッキングでDnaK384-638が58.8%のブロッキング効率であるのに対し、87.5%の効率でブロッキングが行われていることが判明した。この速度は、3時間後で同等の効果を示すBSAと比べても速く、非常に早い段階でポリスチレンプレートに吸着してブロッキング効果を発揮すると予想される。よって、本発明を用いることで、従来のBSAと同等もしくはそれ以上の性能を有する、新規なブロッキング剤を開発できる可能性が考えられる。

#### 【0058】

また本発明は、1以上の親水性ドメインと1以上の疎水性ドメインを有するブロッキング用タンパク質であって、疎水性ドメインが器壁に吸着可能であり、親水性ドメインが器壁に吸着した疎水性ドメインを覆うことが可能であるブロッキング用タンパク質である。ここでいうドメインとは好ましくは50アミノ酸以上からなる構造的なアミノ酸のまとまりであり、一部を欠損、付加などされたものについてもドメインとみなす。

#### 【0059】

また、本発明は、ブロッキング速度についても規定する。すなわち、ブロッキング速度がBSAよりも向上していることを特徴とする改変されたタンパク質である。また詳しくは、3時間のブロッキングにおいてBSAと同等のブロッキング効率を示すようにタンパク質量を揃えた条件において、10分未満のブロッキング能がBSAよりも優れることを特徴とする改変されたタンパク質である。ここで改変されたとは、野生型のタンパク質をコードする遺伝子配列が、アミノ酸置換、デリション、挿入などによって変換されたということを示している。評価方法としては、特に限定されないが、実施例5に示した方法が好ましく用いられ、IgGのポリスチレンプレートへの非特異的な吸着を指標に測定される。評価方法としては、1～10分間、好ましくは2～10分間ブロッキングを行った後、PBS(-)で希釈したヒト血清を添加し、37℃・60分間インキュベートした後、洗浄を行い、至適濃度の抗ヒトIgG抗体（ペルオキシダーゼ結合）を反応させ、洗浄後、TMBZの発色により非特異吸着したIgG量を測定する。また、この実施例においては、0.7mg/mlのDnaK419-607と3時間後に同等のブロッキング能を示すBSAとして2.4mg/mlの

BSA(Fraction V; シグマ社製 (Code: A-4503) )を用いた (タンパク質量はブラッドフォード法にて測定)。検体タンパク質の量はブロッキング能を測定する常識的な範囲で用いられればそれで良いが、好ましくは0.5~1mgの範囲で用いられることが好ましい。また、本測定に用いるBSAの濃度は、検体タンパク質の3時間目のブロッキング効率と同等のブロッキング効率を示す量を用いるが、これはあらかじめ濃度の検討が必要である。それらのタンパク質を溶解するバッファーとしては、20mM Tris-HCl (pH7.0) が好ましく用いられる。

#### 【0060】

本発明に用いるタンパク質もしくはタンパク質フラグメントはタグを有していても良く、実際、検討にはアミノ末端にヒスチジンタグを付加したものをを用いて検討を行った。タグとしては、ヒスチジンタグ、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) タグ、MBP (マルトースバインディングプロテイン) タグ、Flagタグ、Mycタグ、TAP (タンデムアフィニティーピュリフィケーション) タグなど、どのタグを採用しても良く、必要に応じて任意のタンパク質を融合して用いても良い。また、既知のタグに任意のアミノ酸配列などを付加しても良い。

#### 【0061】

本タンパク質の発現方法は特に限定されないが、原核生物を用いて発現させる方法が好ましく、さらには、大腸菌を用いて発現させる方法がさらに好ましい。また、発現ベクターに関しても特に限定されず、一般的に発現に使用されるものであればよい。

#### 【0062】

本発明のタンパク質の精製方法は、上記タグを用いた精製方法以外に、粗精製溶液を適当な温度で加熱して、その遠心上清を精製すると効率よく精製できる場合がある。加熱は好ましくは50℃以上、更に好ましくは70℃以上で行われる。今回用いたDnaKの基質結合ドメインも熱への耐性があり、70℃、30分間という条件では、凝集が認められず、遠心上清画分にタンパク質が残ることを確認している。よって、精製する場合は、この加熱遠心上清を、カラムクロマトすることなどにより、簡単にタンパク質の精製をすることが出来、非常に経済的である。また

、加熱工程を経ることにより、共存している酵素類を失活させる効果も期待できる。

#### 【0063】

本発明のブロッキング効率の向上したタンパク質は、ブロッキング剤、賦形剤、安定化剤、リフォールディング補助剤、コーティング剤、医療用コーティング剤などへ応用可能である。特に、免疫反応を利用した検出システムでのブロッキング剤としての期待が大きく、ELISA、免疫組織染色、ウエスタンブロッティングなどへの使用が可能であると予想される。実際、今回の発明を完成させるにあたり、ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)への応用の可能性を調べたところ、実際に良好な結果を得ている(図12)。

#### 【0064】

本発明の一実施形態は、DnaK419-607を含有するブロッキング剤、賦形剤、安定化剤、リフォールディング補助剤である。

#### 【0065】

本発明の一実施形態は、DnaK384-607(D479V、D481V)を含有するブロッキング剤、賦形剤、安定化剤、リフォールディング補助剤である。

#### 【実施例】

以下に、本発明の実施例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとする。

#### 【0066】

##### 実施例1 候補タンパク質のスクリーニング

アミノ酸配列からの候補タンパク質のスクリーニングには、主に核酸・アミノ酸配列解析ソフト: GENETYX(ソフトウェア開発株式会社)を用いて行った。このソフトウェアはタンパク質のアミノ酸一次配列から親水性アミノ酸残基および疎水性アミノ酸残基の数を算出する機能を有しており便利であった。様々なブロッキング能を示すことの判明しているタンパク質、および大腸菌由来のタンパク質もしくは部分配列のN末端側半分とC末端側半分の配列に含有される親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の数をGENETYXにて算出し、親水性アミノ酸含有率、疎水性アミノ酸含有率、親水/疎水率および、二分したそれぞれの親水/疎水率の差の

絶対値等をまとめたのが表1および表2である。ここでは、GENETYXの定義に従い、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンとした。また、疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンとした。

#### 【0067】

##### 実施例2 DnaKフラグメントのクローニング、発現

DnaKフラグメントは大腸菌K-12株より抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCR法を用いて目的遺伝子断片を増幅し、クローニングした。遺伝子のPCR増幅には東洋紡製のKOD-Plus-を用いた。具体的にDnaK 384-638の増幅には、50 $\mu$ lの反応液中、反应用バッファー、1 mM MgSO<sub>4</sub>、配列番号3および4に示すプライマーを15pmole、ポリメラーゼ1unitおよび大腸菌DNA 100ngとなるように調製し、94 $^{\circ}$ C・2分間の後、94 $^{\circ}$ C・15秒、55 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・1分のサイクルを25回行った。また同様に、DnaK 386-586の増幅には配列番号3および4に示したプライマーを用いて増幅を行った。増幅したDNA断片は制限酵素BamHIにて消化し、pQE30のBamHI-SmaIサイトへクローニングした（KOD-Plus-によって増幅されたDNA断片は平滑化されているため、増幅断片の下流側についてはそのまま使用した）。クローニングした遺伝子の配列はシーケンス解析により確認した。このベクターにクローニングすることにより目的タンパク質のN末端に6 $\times$ His配列（Hisタグ）を付加することができる。このようにして、発現プラスミドpQE-DnaK384-638を作製した。

#### 【0068】

タンパク質の発現・精製は、遺伝子を導入したJM109をLB培地にて16時間振とう培養し、菌体を遠心分離法により回収し、20mM Tris-HCl(pH7.0)へ懸濁、超音波破碎を行った後、15,000r.p.m.にて10分間微量高速遠心機を用いて遠心して得られた上清を用いて行った。具体的には、HIS-Select HC Nickel Affinity Gel (SIGMA社製)を用いて、精製し、最終的に20mM Tris-HCl(pH7.0)に対して一晚透析し、実験に用いた。タンパク質濃度の測定は、BSAをスタンダードとしたブラッドフォード法を用いて行った（BIORAD社、Bio-Rad Protein Assayキット；5

00-0006)。

### 【0069】

#### 実施例3 C末端除去DnaKクローンおよびポイントミュータントの作製

C末端除去DnaKクローンの作製は、実施例1で作製したpQE-DnaK384-638を鋳型として用いQuick Change法を用いて任意の場所にストップコドンを導入することにより作製した。実際にはQuick Change site directive mutagenesis kit (stratagene社製)を用い、その取り扱い説明書に従って実施した。それぞれの作製クローンとそれに使用したプライマー配列の組み合わせを以下に示す。DnaK 384-607:配列番号5と6、DnaK384-578:配列番号7と8、DnaK384-561:配列番号9と10。また、DnaK 384-607(D479V, D481V)はpQE-DnaK384-607を鋳型として用い、配列番号11と12を用いて変異導入を実施した。それぞれ作製した変異体はシーケンス解析により配列を確認した後、実施例1に記載の方法に従って、タンパク質を調製した。

### 【0070】

#### 実施例4 N末端除去DnaKクローンの作製

実施例2で作成した、pQE-DnaK384-607を鋳型として次に示すプライマーを用いてPCR増幅を行い、実施例1に方法に従って、pQE30ベクターのBamHI-SmaIサイトに導入した。作製したクローンと用いたプライマーのセットは以下のとおりである。DnaK 508-607:配列番号13と2、DnaK 525-607:配列番号14と2、DnaK 419-607:配列番号15と2。それぞれ作製した変異体はシーケンス解析により配列を確認した後、実施例1に記載の方法に従って、タンパク質を調製した。

### 【0071】

#### 実施例5 ブロッキング効果

ブロッキング効率は以下の方法を用いて測定した。

ポリスチレンプレートへのヒト血清IgGの非特異吸着を指標として検討を実施した。

方法としては、20mM Tris-HCl (pH7.0)に希釈したBSA(Sigma社、Fraction V)および各種変異体DnaKサンプル 100 $\mu$ lをポリスチレン製96ウェルイムノプレート (C

ostar社製; E.I.A./R.I.A 8Well Strip) に添加し、4℃にて4時間静置した(基本的には4時間静置したが、ブロッキング時間を検討する場合は任意の時間を設定した)。その後、プレートから溶液を除去した後、正常人血清をPBS (-) にて50倍希釈し、50  $\mu$ l を添加、37℃にて1時間インキュベートした。次に、各ウェルを200  $\mu$ l の洗浄液 (PBS(-), 0.05%Tween20) にて4回洗浄し、至適濃度に抗体希釈液 (0.01M PB(pH7.4)、0.15M NaCl、0.5% カゼイン) で希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch社製) 50  $\mu$ l を各ウェルに添加し、37℃にて1時間インキュベートした。次に、各ウェルを200  $\mu$ l の洗浄液 (PBS (-), 0.05%Tween20) にて4回洗浄し、発色試薬 (テトラメチルベンジジン (TMBZ : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) ) を100  $\mu$ l 添加、室温で5分間発色させた後、1N硫酸50  $\mu$ l を加え反応を停止させた。発色は、ELISAリーダーにて主波長450nm、副波長650nmにて測定した。タンパク質の定量にはブラッドフォード法を用いた。

#### 【0072】

まず、0.7mg/ml に調製したBSA、DnaK 384-638、DnaK 384-607、DnaK 384-578、DnaK 508-607、DnaK 525-607について、4時間でのブロッキング効率を測定したところ、図5に示すように、BSA、DnaK 384-638、DnaK 384-607以外のものについては、ブロッキング効果が低い結果であった。ブロッキング効果が低かったクローンは、DnaK 384-607、DnaK 384-578については、 $\alpha$ ヘリックスを削ったクローン、DnaK 508-607、DnaK 525-607は $\beta$ シートを削ったクローンであり、DnaKの基質結合ドメインを用いるブロッキングには $\alpha$ ヘリックス構造と $\beta$ シート構造の両方が必要であることが推察された。

#### 【0073】

次に、 $\beta$ シート部分の疎水性を向上させる目的で作製した、DnaK 384-607(D479V, D481V)とDnaK 419-607(それぞれ0.7mg/ml)と同濃度のBSAとDnaK 384-607をコントロールとして、ブロッキング4時間でのブロッキング効果を比較した。その結果、DnaK 384-607(D479V, D481V)、DnaK 419-607ともに、同濃度のBSAよりもブロッキング効率が高く、特にDnaK 419-607で顕著であった(図9)。

#### 【0074】



更に、上記実験で最も効果の高かったDnaK 419-607とDnaK 384-638、BSAについて、ブロッキング濃度とブロッキング4時間目でのブロッキング効果について調べた。その結果、0.15mg/mlのDnaK 419-607は12mg/mlのBSAよりもブロッキング効果が顕著であり、非常に低濃度でブロッキング剤として使用可能であることが示唆された(図10)。

#### 【0075】

最後に、更に、上記実験で最も効果の高かったDnaK 419-607とDnaK 384-638、BSAについて、ブロッキング時間とブロッキング効果について検討を行った。タンパク質濃度は、DnaK 419-607とDnaK 384-638については0.7mg/mlとし、BSAは上記検討で0.7mg/mlのDnaK 419-607と同等のブロッキング効果を示した2.4mg/mlで用いた。その結果、DnaK 419-607のブロッキングに要する時間が飛躍的に短く約10分程度で十分効果的なブロッキング効果が得られ、3時間後に同等の効果の見られた2.4mg/mlのBSAより早くブロッキング効果を示すことが分かった(図11)。

#### 【0076】

##### 実施例6 ブロッキング効果 (ELISA)

ヒト癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antibody: hCEA) のELISAシステムを用いてDnaKフラグメントのブロッキング剤としての有用性を検討した。まず、抗hCEA MoAbを50mM炭酸緩衝液 (pH9.6) で10 $\mu$ g/mlに希釈後、100 $\mu$ lづつポリスチレン製96ウェルイムノプレート (Costar社製; E.I.A./R.I.A 8Well Strip) へ添加後、37℃・1時間静置した。静置後、洗浄液 (PBS(-), 0.05%Tween20) 150 $\mu$ lにて3回ウェルを洗浄した後、ブロック液を200 $\mu$ lづつ添加し、4℃・4時間静置した。ブロック液としては、一般的に使用される2.4mg/mlのBSA (20mM Tris-HCl (pH7.0))、および同様の緩衝液に溶解したDnaK 419-607を用い、ブランクは20mM Tris-HCl (pH7.0で行った。ブロック液廃棄後、0、2.5ng/ml、5ng/mlに希釈したhCEA溶液 (イムノフローラ: 東洋紡製) を50 $\mu$ lづつ添加し、37℃にて1時間インキュベート後、150 $\mu$ lの洗浄液にて4回洗浄実施した。その後、至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗hCEA抗体 (イムノフローラ: 東洋紡製) を添加、37℃・1h反応後、さらに洗浄液 (PBS(-), 0.05%Tween20) 150 $\mu$ lにて3回ウェル

を洗浄した。次に、基質溶液(テトラメチルベンジジン (TMBZ: 3,3',5,5'-Tetra methylbenzidine) ) 100 $\mu$ lを添加し、遮光して37℃、20分間発色させた。最後に、反応停止液(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 100 $\mu$ lを添加し、黄色の発色を450nm/650nmで測定した。

#### 【0077】

その結果、ブランクでは測定の直線性が失われているのに対し、DnaK 419-607はBSA同様に直線性の良い結果が得られ、本発明のDnaK 419-607が免疫学的測定にも十分適用し得ることが示された(図12)。

#### 【0078】

##### 【発明の効果】

本発明により、アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規タンパク質または部分配列タンパク質を簡便にスクリーニングできるようになり、また、大腸菌で大量発現可能なブロッキング効率の向上したタンパク質の生産が可能となった。本発明によって得られたタンパク質はブロッキング能が高く、従来法に比べ、簡便かつ確実な結果が得られる。

#### 【0079】

##### 【配列表】

Sequence Listing

配列番号 1

配列の長さ: 638

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

配列

Met Gly Lys Ile Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Cys Val

1 5 10 15

Ala Ile Met Asp Gly Thr Thr Pro Arg Val Leu Glu Asn Ala Glu Gly

20 25 30

Asp Arg Thr Thr Pro Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Gln Asp Gly Glu Thr

35 40 45  
Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Arg Gln Ala Val Thr Asn Pro Gln Asn  
50 55 60  
Thr Leu Phe Ala Ile Lys Arg Leu Ile Gly Arg Arg Phe Gln Asp Glu  
65 70 75 80  
Glu Val Gln Arg Asp Val Ser Ile Met Pro Phe Lys Ile Ile Ala Ala  
85 90 95  
Asp Asn Gly Asp Ala Trp Val Glu Val Lys Gly Gln Lys Met Ala Pro  
100 105 110  
Pro Gln Ile Ser Ala Glu Val Leu Lys Lys Met Lys Lys Thr Ala Glu  
115 120 125  
Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Val Thr Glu Ala Val Ile Thr Val Pro Ala  
130 135 140  
Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Arg Ile  
145 150 155 160  
Ala Gly Leu Glu Val Lys Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala  
165 170 175  
Leu Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Gly Thr Gly Asn Arg Thr Ile Ala Val  
180 185 190  
Tyr Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Ile Ser Ile Ile Glu Ile Asp  
195 200 205  
Glu Val Asp Gly Glu Lys Thr Phe Glu Val Leu Ala Thr Asn Gly Asp  
210 215 220  
Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Ser Arg Leu Ile Asn Tyr Leu  
225 230 235 240  
Val Glu Glu Phe Lys Lys Asp Gln Gly Ile Asp Leu Arg Asn Asp Pro  
245 250 255  
Leu Ala Met Gln Arg Leu Lys Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Ile Glu  
260 265 270

Leu Ser Ser Ala Gln Gln Thr Asp Val Asn Leu Pro Tyr Ile Thr Ala  
275 280 285  
Asp Ala Thr Gly Pro Lys His Met Asn Ile Lys Val Thr Arg Ala Lys  
290 295 300  
Leu Glu Ser Leu Val Glu Asp Leu Val Asn Arg Ser Ile Glu Pro Leu  
305 310 315 320  
Lys Val Ala Leu Gln Asp Ala Gly Leu Ser Val Ser Asp Ile Asp Asp  
325 330 335  
Val Ile Leu Val Gly Gly Gln Thr Arg Met Pro Met Val Gln Lys Lys  
340 345 350  
Val Ala Glu Phe Phe Gly Lys Glu Pro Arg Lys Asp Val Asn Pro Asp  
355 360 365  
Glu Ala Val Ala Ile Gly Ala Ala Val Gln Gly Gly Val Leu Thr Gly  
370 375 380  
Asp Val Lys Asp Val Leu Leu Leu Asp Val Thr Pro Leu Ser Leu Gly  
385 390 395 400  
Ile Glu Thr Met Gly Gly Val Met Thr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Thr  
405 410 415  
Thr Ile Pro Thr Lys His Ser Gln Val Phe Ser Thr Ala Glu Asp Asn  
420 425 430  
Gln Ser Ala Val Thr Ile His Val Leu Gln Gly Glu Arg Lys Arg Ala  
435 440 445  
Ala Asp Asn Lys Ser Leu Gly Gln Phe Asn Leu Asp Gly Ile Asn Pro  
450 455 460  
Ala Pro Arg Gly Met Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile Asp Ala  
465 470 475 480  
Asp Gly Ile Leu His Val Ser Ala Lys Asp Lys Asn Ser Gly Lys Glu  
485 490 495  
Gln Lys Ile Thr Ile Lys Ala Ser Ser Gly Leu Asn Glu Asp Glu Ile

500 505 510  
Gln Lys Met Val Arg Asp Ala Glu Ala Asn Ala Glu Ala Asp Arg Lys  
515 520 525  
Phe Glu Glu Leu Val Gln Thr Arg Asn Gln Gly Asp His Leu Leu His  
530 535 540  
Ser Thr Arg Lys Gln Val Glu Glu Ala Gly Asp Lys Leu Pro Ala Asp  
545 550 555 560  
Asp Lys Thr Ala Ile Glu Ser Ala Leu Thr Ala Leu Glu Thr Ala Leu  
565 570 575  
Lys Gly Glu Asp Lys Ala Ala Ile Glu Ala Lys Met Gln Glu Leu Ala  
580 585 590  
Gln Val Ser Gln Lys Leu Met Glu Ile Ala Gln Gln Gln His Ala Gln  
595 600 605  
Gln Gln Thr Ala Gly Ala Asp Ala Ser Ala Asn Asn Ala Lys Asp Asp  
610 615 620  
Asp Val Val Asp Ala Glu Phe Glu Glu Val Lys Asp Lys Lys  
625 630 635

## 【 0 0 8 0 】

配列番号 2

配列の長さ: 1917

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

配列の特徴: mature peptide 4-1914

配列

ATGGGTAAAA TAATTGGTAT CGACCTGGGT ACTACCAACT CTTGTGTAGC GATTATGGAT 60  
GGCACCCTC CTCGCGTGCT GGAGAACGCC GAAGGCGATC GCACCACGCC TTCTATCATT 120

GCCTATACCC AGGATGGTGA AACTCTAGTT GGTCAGCCGG CTAAACGTCA GGCAGTGACG 180  
AACCCGCAAA AACTCTGTT TGCATTAAA CGCCTGATTG GTCGCCGCTT CCAGGACGAA 240  
GAAGTACAGC GTGATGTTTC CATCATGCCG TTCAAAATTA TTGCTGCTGA TAACGGCGAC 300  
GCATGGGTCG AAGTTAAAGG CCAGAAAATG GCACCGCCGC AGATTTCTGC TGAAGTGCTG 360  
AAAAAATGA AGAAAACCGC TGAAGATTAC CTGGGTGAAC CGGTAAGTGA AGCTGTTATC 420  
ACCGTACCGG CATACTTTAA CGATGCTCAG CGTCAGGCAA CCAAAGACGC AGGCCGTATC 480  
GCTGGTCTGG AAGTAAACG TATCATCAAC GAACCGACCG CAGCTGCGCT GGCTTACGGT 540  
CTGGACAAAG GCACTGGCAA CCGTACTATC GCGGTTTATG ACCTGGGTGG TGGTACTTTC 600  
GATATTTCTA TTATCGAAAT CGACGAAGTT GACGGCGAAA AAACCTTCGA AGTTCTGGCA 660  
ACCAACGGTG ATACCCACCT GGGGGGTGAA GACTTCGACA GCCGTCTGAT CAACTATCTG 720  
GTTGAAGAAT TCAAGAAAGA TCAGGGCATT GACCTGCGCA ACGATCCGCT GGCAATGCAG 780  
CGCCTGAAAG AAGCGGCAGA AAAAGCGAAA ATCGAACTGT CTTCCGCTCA GCAGACCGAC 840  
GTAAACCTGC CATAATCAC TGCAGACGCG ACCGGTCCGA AACACATGAA CATCAAAGTG 900  
ACTCGTGCGA AACTGGAAAG CCTGGTTGAA GATCTGGTAA ACCGTTCCAT TGAGCCGCTG 960  
AAAGTTGCAC TGCAGGACGC TGGCCTGTCC GTATCTGATA TCGACGACGT TATCCTCGTT 1020  
GGTGGTCAGA CTCGTATGCC AATGGTTCAG AAGAAAGTTG CTGAGTTCTT TGGTAAAGAG 1080  
CCGCGTAAAG ACGTTAACCC GGACGAAGCT GTAGCAATCG GTGCTGCTGT TCAGGGTGGT 1140  
GTTCTGACTG GTGACGTAAG AGACGTACTG CTGCTGGACG TTACCCCGCT GTCTCTGGGT 1200  
ATCGAAACCA TGGGCGGTGT GATGACGACG CTGATCGCGA AAAACACCAC TATCCCGACC 1260  
AAGCACAGCC AGGTGTTCTC TACCGCTGAA GACAACCAGT CTGCGGTAAC CATCCATGTG 1320  
CTGCAGGGTG AACGTAAACG TGC GGCTGAT AACAAATCTC TGGGTCAGTT CAACCTAGAT 1380  
GGTATCAACC CGGCACCGCG CGGCATGCCG CAGATCGAAG TTACCTTCGA TATCGATGCT 1440  
GACGGTATCC TGCACGTTTC CGCGAAAGAT AAAACAGCG GTAAAGAGCA GAAGATCACC 1500  
ATCAAGGCTT CTTCTGGTCT GAACGAAGAT GAAATCCAGA AAATGGTACG CGACGCAGAA 1560  
GCTAACGCCG AAGCTGACCG TAAGTTTGAA GAGCTGGTAC AGACTCGCAA CCAGGGCGAC 1620  
CATCTGCTGC ACAGCACCCG TAAGCAGGTT GAAGAAGCAG GCGACAAACT GCCGGCTGAC 1680  
GACAAACTG CTATCGAGTC TGC GCTGACT GCACTGGAAG CTGCTCTGAA AGGTGAAGAC 1740  
AAAGCCGCTA TCGAAGCGAA AATGCAGGAA CTGGCACAGG TTTCCAGAA ACTGATGGAA 1800  
ATCGCCAGC AGCAACATGC CCAGCAGCAG ACTGCCGGTG CTGATGCTTC TGCAAACAAC 1860

GC GAAAGATG ACGATGTTGT CGACGCTGAA TTTGAAGAAG TCAAAGACAA AAAATAA 1917

## 【 0 0 8 1 】

配列番号3

配列の長さ：55

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCGGATCCAT CGAGGGTAGA GGTGACGTAA AAGACGTACT GCTGCTGGAC GTTAC

55

## 【 0 0 8 2 】

配列番号4

配列の長さ：33

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTATTTTGTG TCTTTGACTT CTTCAAATTC AGC

33

## 【 0 0 8 3 】

配列番号5

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCCGGCTGAC GACTAAACTG CTATCGAGTC

30

【 0 0 8 4 】

配列番号6

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GACTCGATAG CAGTTTAGTC GTCAGCCGGC

30

【 0 0 8 5 】

配列番号7

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TGCTCTGAAA GGTTAAGACA AAGCCGCTAT

27

【 0 0 8 6 】



配列番号8

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATAGCGGCTT TGTCTTAACC TTTCAGAGCA

27

【 0 0 8 7 】

配列番号9

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCAGCAACAT GCCTAACAGC AGACTGCCCGG

30

【 0 0 8 8 】

配列番号10

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCGGCAGTCT GCTGTTAGGC ATGTTGCTGC

30

【 0 0 8 9 】

配列番号11

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCTTCGATAT CGTTGCTGTC GGTATCCTGC

30

【 0 0 9 0 】

配列番号12

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCAGGATACC GACAGCAACG ATATCGAAGG

30

【 0 0 9 1 】

配列番号13

配列の長さ：27

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

TCTGGATCCA ACGAAGATGA AATCCAG

27

【0092】

配列番号14

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

GCGGATCCGC TGACCGTAAG TTTGAAGAGC

30

【0093】

配列番号15

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CCGGATCCCC GACCAAGCAC AGCCAGGTG

30

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】ブロッキング効率測定概念を示す図。

【図 2】タンパク質の2分割法を示す図

【図 3】ブロッキング能を示すタンパク質のブロッキング機構を示す図。

【図 4】DnaK 384-607の立体構造を示す図。

$\beta$ シート部分がN末端、 $\alpha$ ヘリックス部分がC末端に相当する。

【図 5】種々のDnaK変異体の示すブロッキング効率を示す図。図 5において、

Blank: ブロッキングなし

384-638: DnaK384-638

384-607: DnaK384-607

384-578: DnaK384-578;  $\alpha$ ヘリックスの一部の構造が除去された変異体

384-561: DnaK384-561;  $\alpha$ ヘリックスの約半分の構造が除去された変異体

508-607: DnaK508-607;  $\beta$ シート部分が除去された変異体 ( $\alpha$ ヘリックスからなる)

525-607: DnaK525-607;  $\beta$ シート部分と $\alpha$ ヘリックスの一部が除去された変異体 ( $\alpha$ ヘリックスからなる)

BSA: BSA fractionV

【図 6】大腸菌DnaKタンパク質の構造、および作成した変異体の構造を示す図。

【図 7】DnaK 381-553の立体構造を示す図。

【図 8】疎水ドメインを改変したタンパク質のブロッキング機構を示す図。

【図 9】種々のDnaK変異体の示すブロッキング効率を示す図。

384-607: DnaK384-607

384-607(VAV): DnaK384-607(D479V, D481V)

419-607: DnaK419-607

BSA: BSA fraction V

Blank: ブロッキングなし

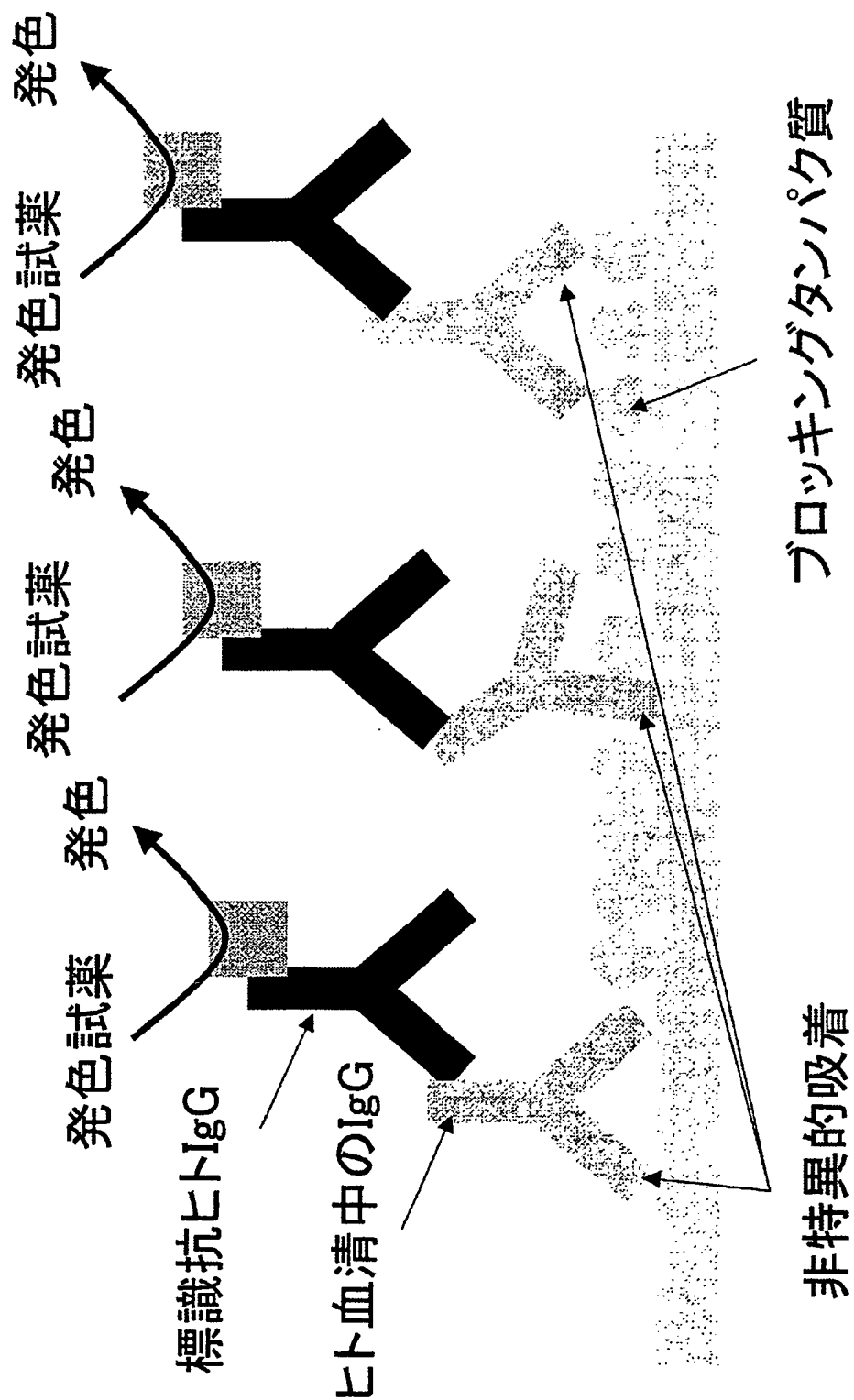
【図 10】DnaK変異体濃度とブロッキング効果の相関を示す図。

【図 11】DnaK変異体のブロッキング速度を示す図。

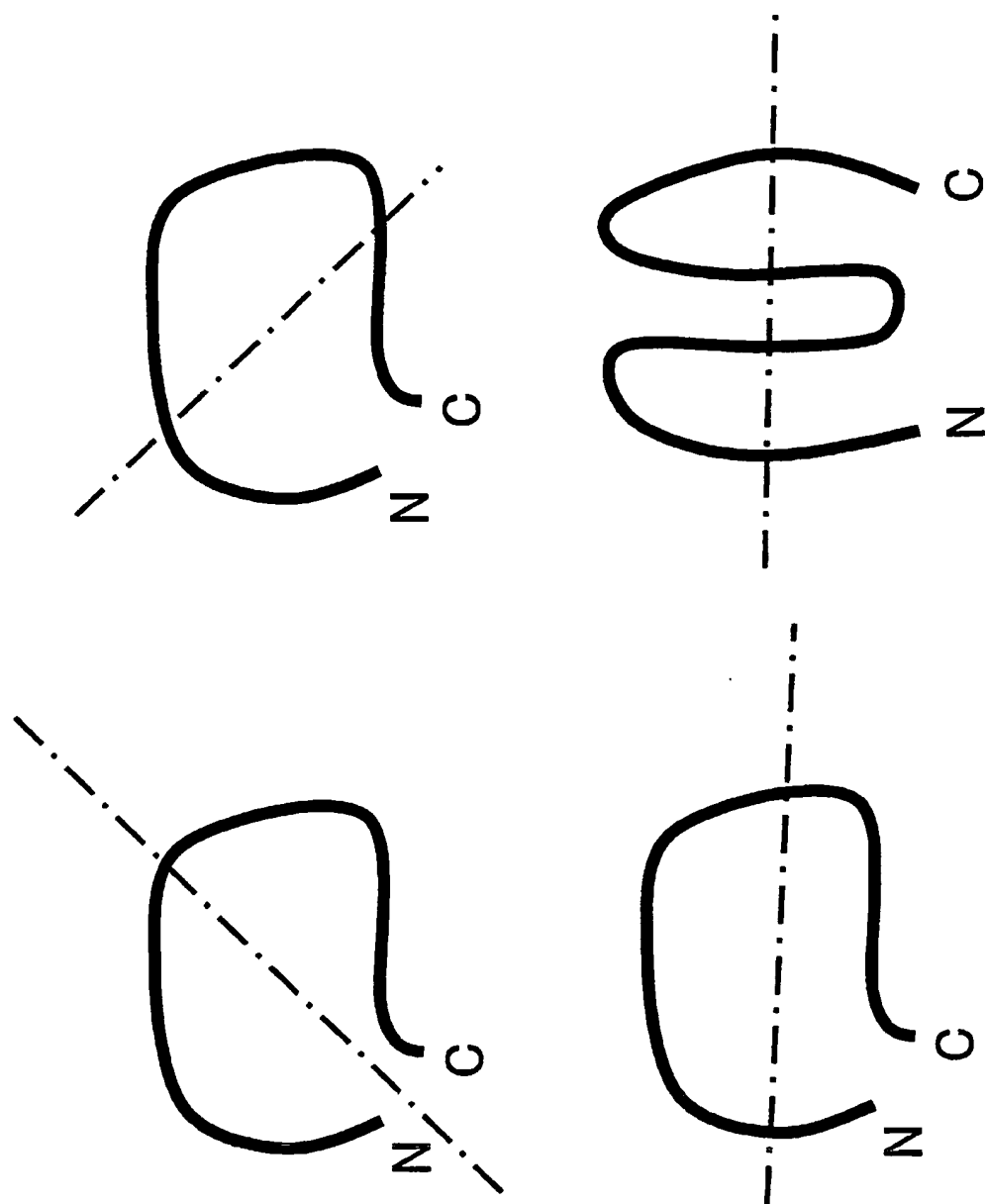
【図 12】DnaK変異体のELISAのブロッキングへの応用を示す図。

【書類名】 図面

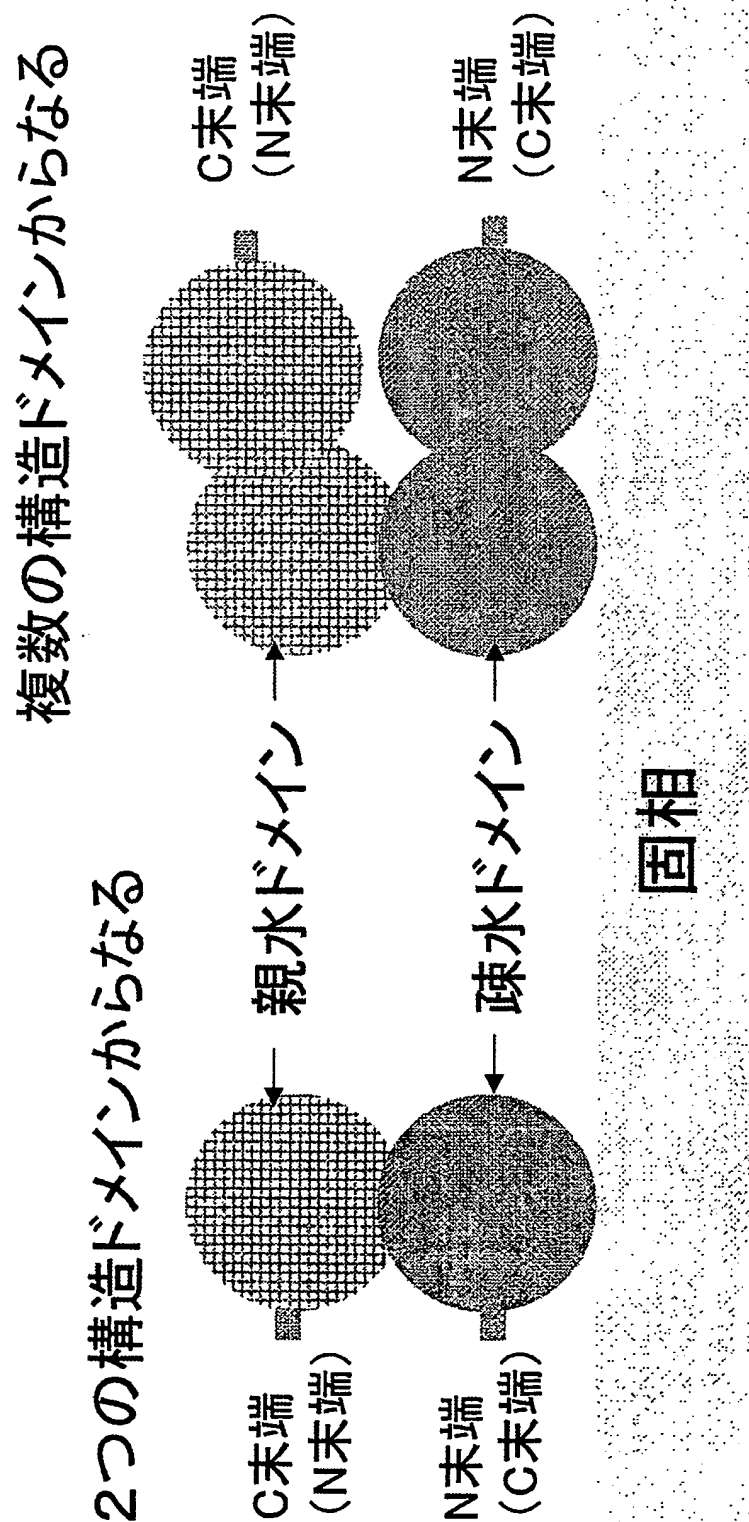
【図1】



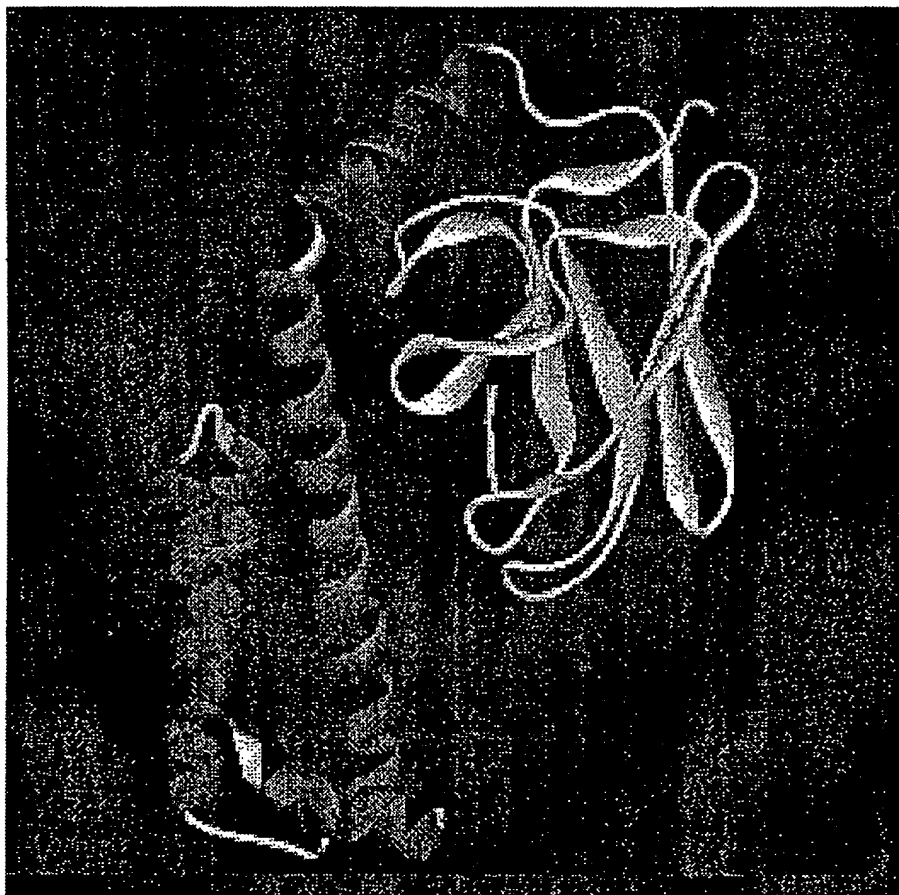
【図 2】



【図 3】

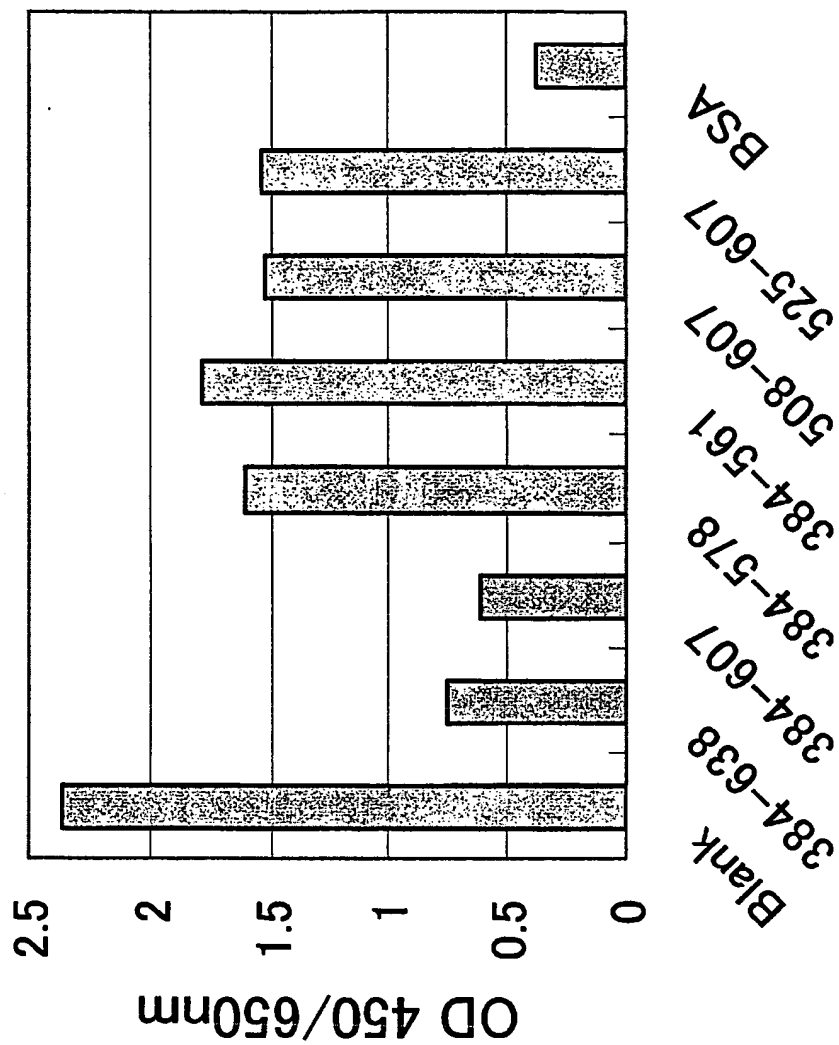


【図4】

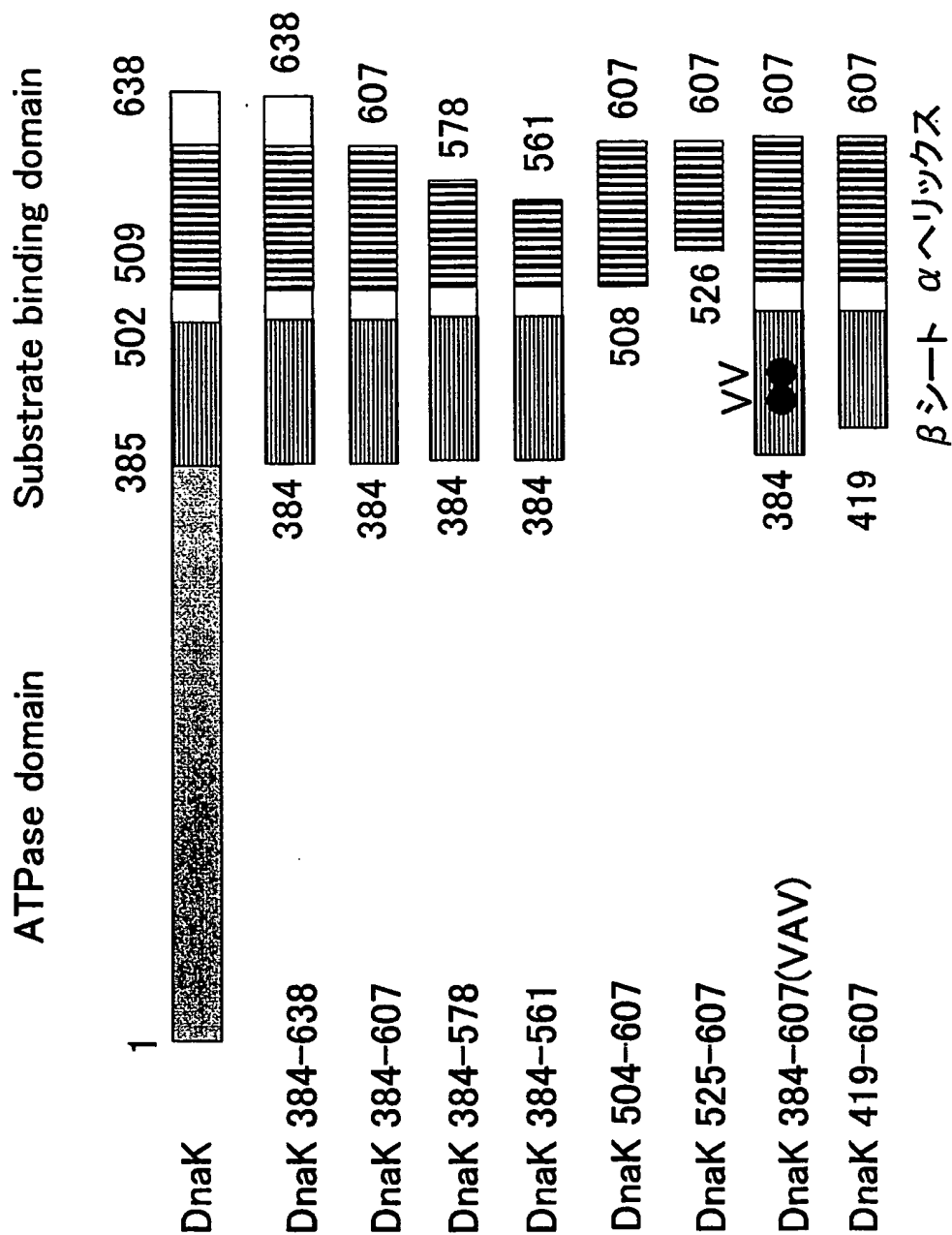




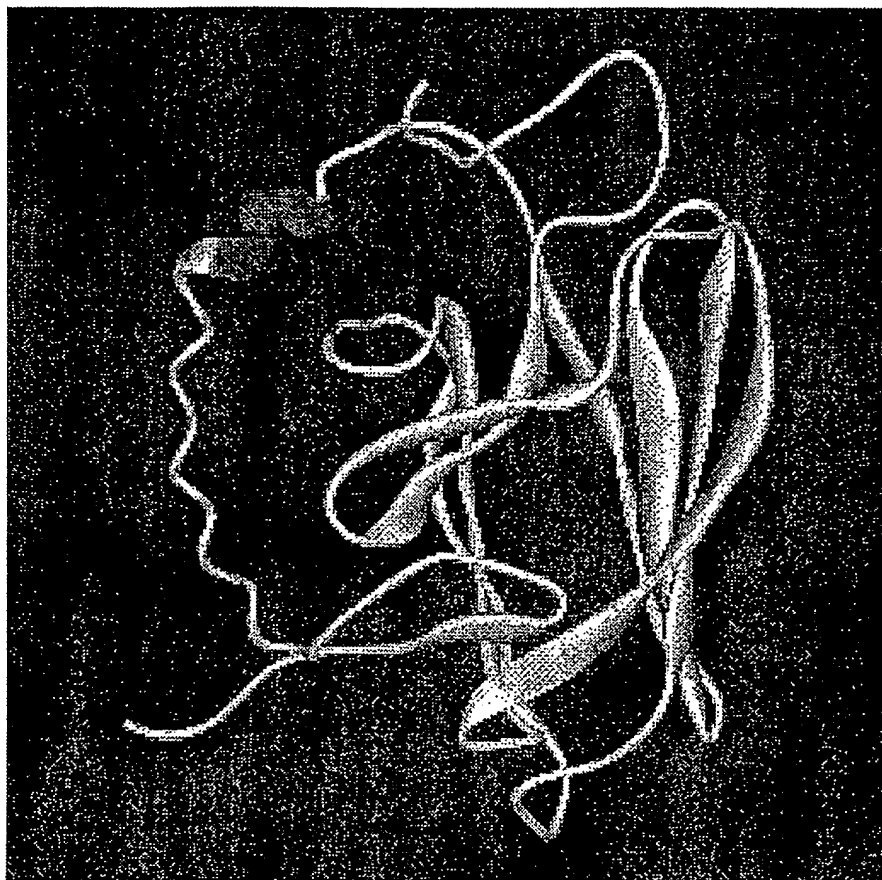
【図 5】



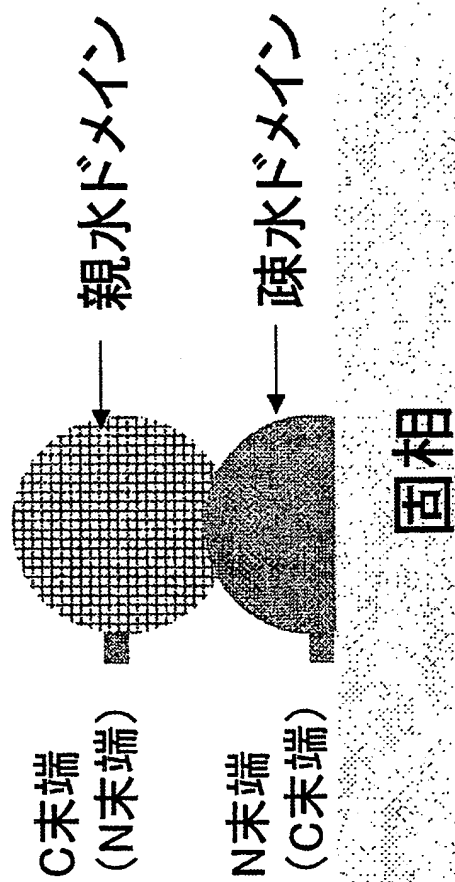
【図 6】



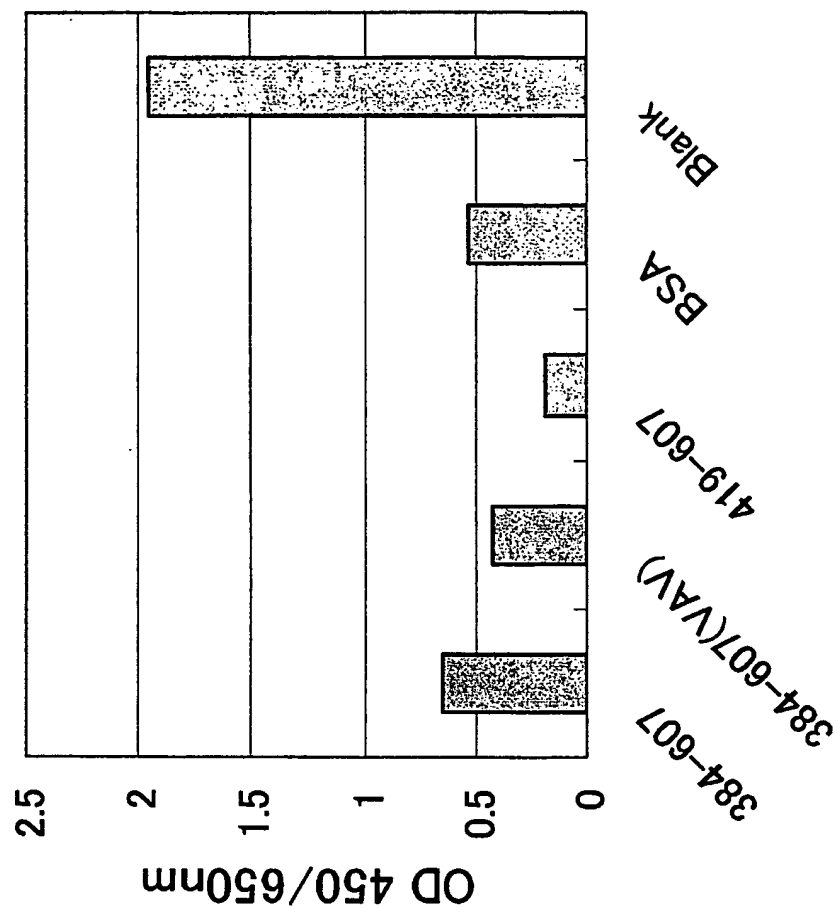
【図7】



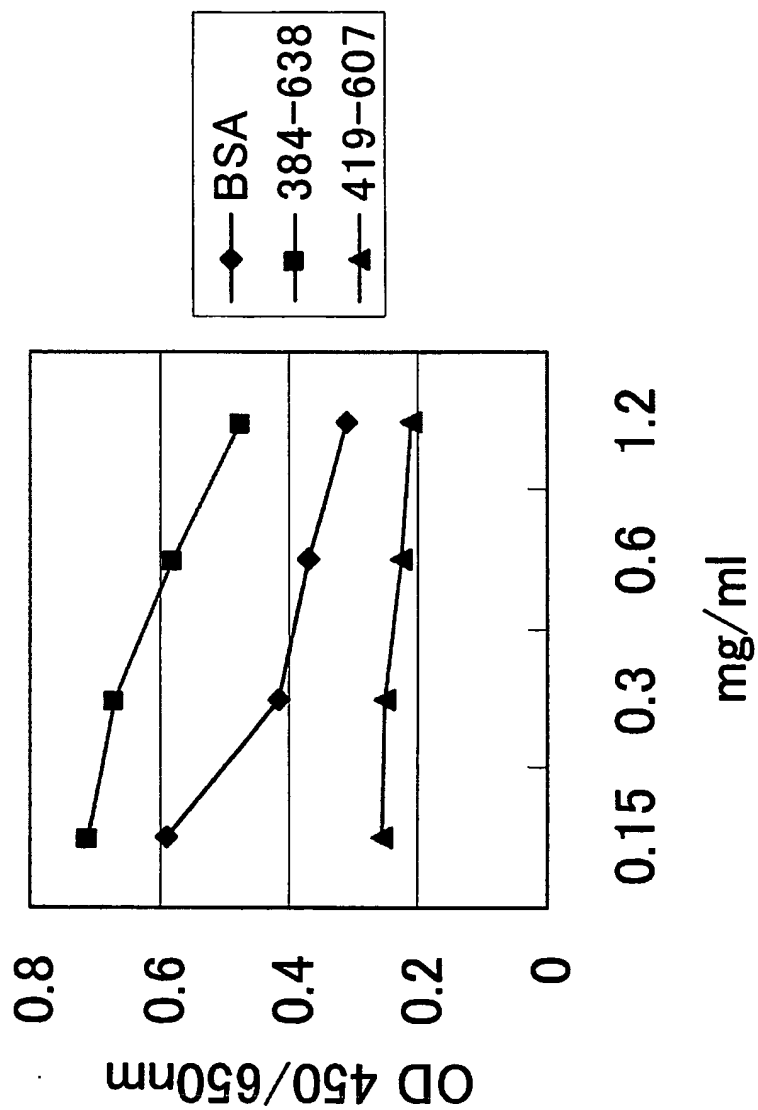
【図8】



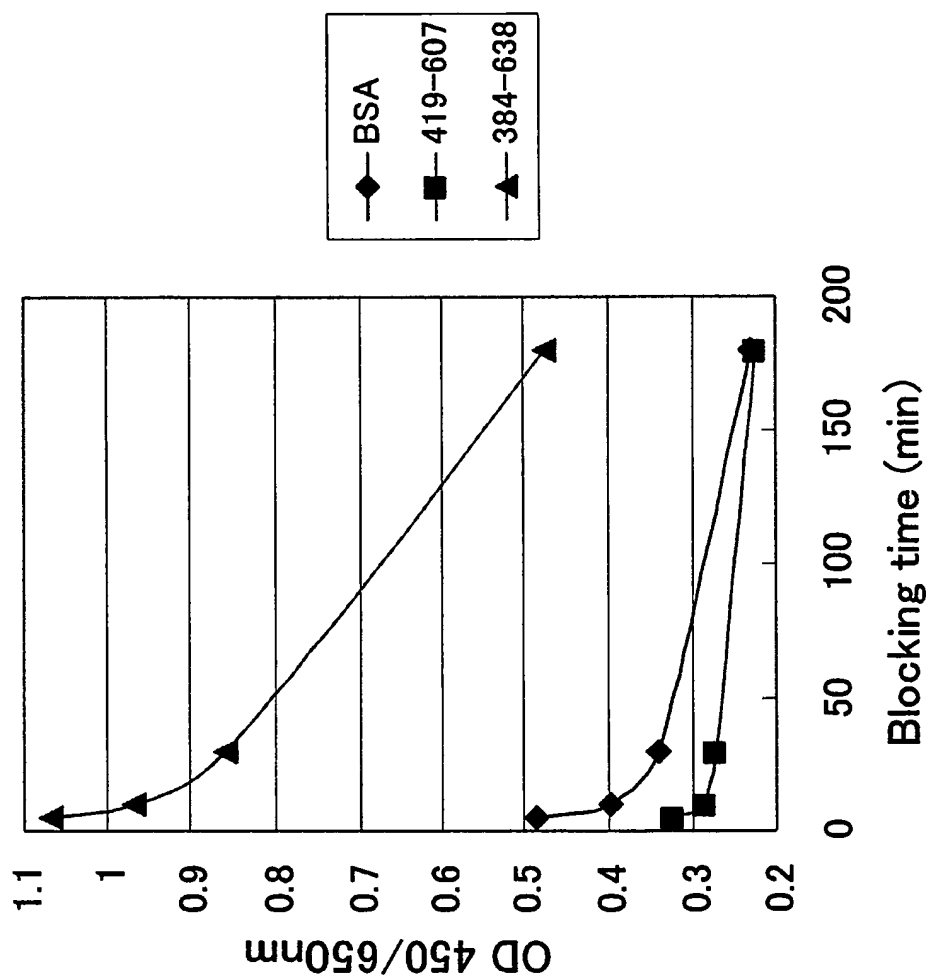
【図 9】



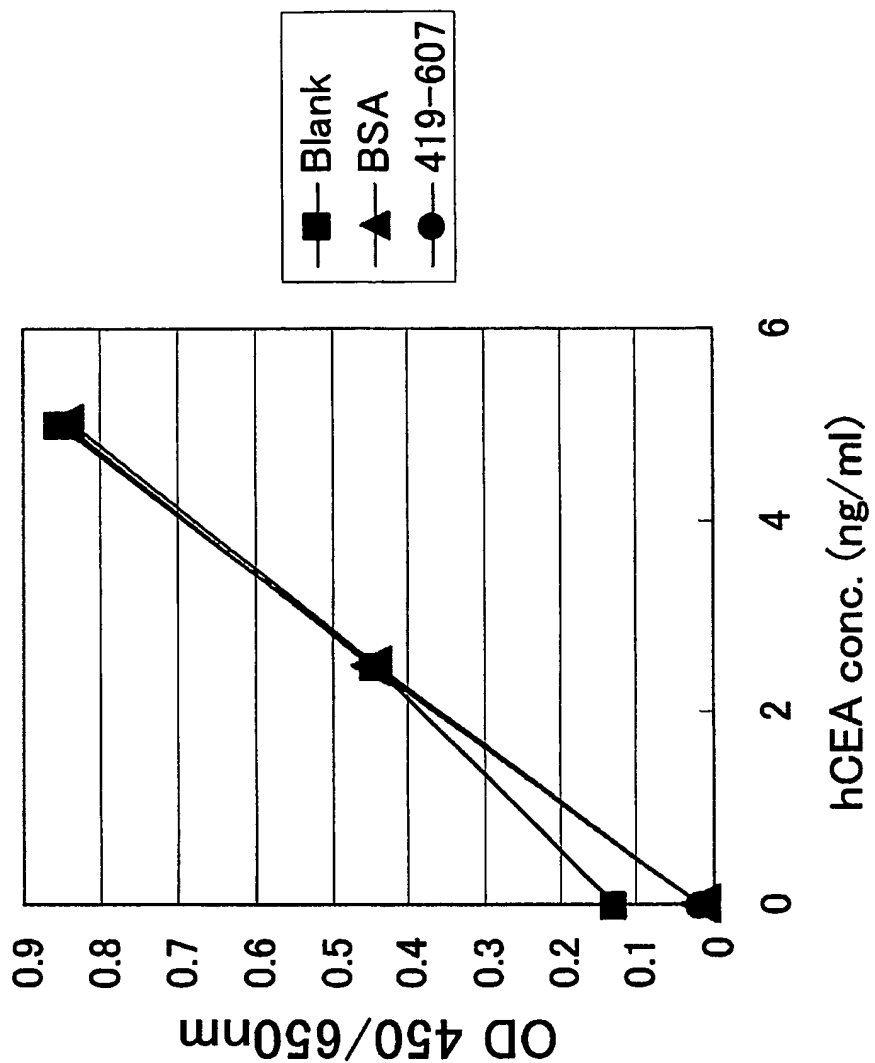
【図10】



【図 11】



【図12】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規タンパク質または新規部分配列タンパク質を簡便にスクリーニングする方法、及び大腸菌で大量発現可能なブロッキング効率の向上したタンパク質を提供する。

【解決手段】 アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規タンパク質または部分配列タンパク質をスクリーニングする方法、及びアミノ酸配列改変によってブロッキング効率の向上したことを特徴とするタンパク質、及び該タンパク質の利用方法。

【選択図】 図 1

特願2003-191081

出願人履歴情報

識別番号 [000003160]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

氏 名

東洋紡績株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**